ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG NEUER TETRANORTRITERPENOIDE MIT METAMORPHOSESTÖRENDER WIRKUNG BEI INSEKTEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

ERWIN KEIL
aus Waldstetten

1984

ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG NEUER TETRANORTRITERPENOIDE MIT METAMORPHOSESTÖRENDER WIRKUNG BEI INSEKTEN

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

ERWIN KEIL
aus Waldstetten

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	27. Juli 1984
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Kraus
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. M. Hanack

Herrn Professor Dr. W. Kraus danke ich herzlich für die Stellung des Themas und für die großzügige Unterstützung und Förderung dieser Arbeit.

Herzlichen Dank für gute Zusammenarbeit möchte ich allen Angehörigen des Instituts für Chemie der Universität Hohenheim aussprechen, insbesondere Herrn Dr. M. Bokel, der die 2D-NMR-Spektren aufnahm und mich bei meinen NMR-Messungen mit wertvollen Ratschlägen unterstützte, Herrn G. Schwinger für die Aufnahme der Massenspektren und Frau M. Schwinger für die Beratung bei den Fraß- und Entwicklungstests.

Abstract

ERWIN KEIL

ISOLIERUNG UND STRUKTURAUFKLÄRUNG NEUER TETRANORTRITERPENOIDE MIT METAMORPHOSESTÖRENDER WIRKUNG BEI INSEKTEN

Aus Blättern von Toona ciliata wurden sechs neue biologisch aktive Triterpenoide isoliert.

Die Auftrennung der Blatt-Extrakte erfolgte durch Chromatographie an großen Mitteldrucksäulen, für die Feintrennung wurden HPLC-Methoden angewandt, wobei Silicagel und chemisch gebundene Octadecyl- und Nitril-Phasen verwendet wurden.

Die Strukturaufklärung wurde mit Hilfe von IR- und Massenspektroskopie und insbesondere mit ^{1}H-Hochfeld-NMR und ^{13}C-NMR-Spektroskopie vorgenommen. Für jede der Substanzen gelang für sämtliche ^{1}H- und ^{13}C-Signale die Zuordnung. Die Kopplungsverhältnisse der Gerüstprotonen wurden geklärt und zusätzlich durch Computersimulation abgesichert. Durch Nuclear-Overhauser-Experimente wurden die jeweiligen Konformationsverhältnisse bewiesen, ^{13}C-^{1}H-korrelierte Spektren unterstützten die Zuordnung der Methylkohlenstoffe.

Die neuen Tetranortriterpenoide sind biogenetisch vom Tirucallol ableitbar, wobei zwei von ihnen unterschiedlich substituierte tetracyclische Ringsysteme aufweisen, während die anderen B-seco-Strukturen besitzen. Allen gemeinsam ist der oxidative Abbau der Seitenkette an C-17 zum α-ständigen Furanring.

Orientierende Tests mit Larven von Epilachna varivestis zeigten geringe Antifeeding-Aktivität der isolierten Substanzen, aber in der Folge führte bei einigen Wirkstoffen die Aufnahme zu erheblichen Störungen im Metamorphoseablauf.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

THEORETISCHER TEIL

1.	Einleitung	1
2.	Anmerkungen zur Biogenese Bezug zu den hier beschriebenen neuen Triterpenoiden	3
3.	Isolierung von Triterpenoiden aus den Blättern von Toona ciliata	9
3.1	Herkunft des Pflanzenmaterials	9
3.2	Vergleich von Ether- und Acetonextrakt	9
3.3	Etherextaktion und Vorreinigung des Extrakts	10
3.4	Isolierung von 6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron	10
3.5	Isolierung von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin und 11α-i-Butyroxyneotrichilenon	11
3.6	Trennung der Toonaphylline	11
4.	Strukturaufklärung der sechs neuen Tetranortriterpenoide	13
4.1	11α-i-Butyroxyneotrichilenon	13
4.1.1	Summenformel und Schmelzpunkt	13
4.1.2	Das IR-Spektrum, Hinweise auf funktionelle Gruppen	
4.1.3	Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 11α-i-Butyroxyneotrichilenon	13
4.1.4	Die Konfiguration und Konformation des Ringes D	15
4.1.5	Die sterochemischen Verhältnisse an den Ringen B und C	17
4.1.5.1	Das 4-Spin-System 9-H, 11-H und 12-Hα/β	17
4.1.5.2	Die Konformationsänderung des Ringes C	18
4.1.5.3	Das 4-Spin-System 5-H, 6-Hα/β und 7-H und die Hydroxylgruppe	20

4.1.6 Der Ring A 21
4.1.7 Der 11α-Substituent 22
4.1.8 Spektrensimulation 24
4.1.9 Interpretation der ^{13}C-Resonanzen 26
4.1.10 Zuordnung der Methylgruppen und der quartären C-Atome 28
4.1.11 Die Struktur des 11α-i-Butyroxyneotrichilenon 29

4.2 Strukturaufklärung von 6α-Acetoxy-14,15-epoxy-azadiron 32
4.2.1 Summenformel und Schmelzpunkt 32
4.2.2 Das IR-Spektrum, Hinweise auf funktionelle Gruppen 32
4.2.3 Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 6α-Acetoxy-14,15-epoxy-azadiron 33
4.2.4 Zuordnung der angulären Methylgruppen durch NOE .. 37
4.2.5 ^{13}C-Zuordnungen von 6α-Acetoxy-14,15-epoxy-azadiron 39
4.2.6 Die ^{13}C-Zuordnungen der Methylgruppen 42
4.2.7 Die Zuordnung von C-4, C-8, C-10 und C-13 44

4.3 Strukturaufklärung von 6-Acetoxytoonaphyllin 49
4.3.1 Summenformel und Schmelzpunkt..... 49
4.3.2 Das IR-Spektrum des 6-Acetoxytoonaphyllins 49
4.3.3 Diskussion der ^{13}C-NMR-Spektren von 6-Acetoxy-toonaphyllin 50
4.3.4 Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 6-Acetoxytoonaphyllin 54
4.3.5 Homodecoupling-Experimente am ^{1}H-Spektrum und Zuordnung der Gerüstprotonen 56
4.3.6 Die chemische Verschiebung der Methylgruppen 60
4.3.7 NOE-Experimente an 6-Acetoxytoonaphyllin 62

4.4 Strukturaufklärung von Toonaphyllin (12) und 6-Hydroxytoonaphyllin (13) 65
4.4.1 Summenformel und Schmelzpunkte von Toonaphyllin (12) und 6-Hydroxytoonaphyllin (13) 65
4.4.2 Das IR-Spektrum von (12) und (13) 66
4.4.3 Interpretation des ^{1}H-NMR-Spektrums von Toona-phyllin und Homodecoupling-Experimente 66

4.4.3.1 NOE-Messungen am Toonaphyllin 72
4.4.4 Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 6-Hydroxytoonaphyllin (Abb. 37) 74
4.4.5 Vergleich der chemischen Verschiebungen der angulären Methylgruppen 77
4.4.6 Die ^{13}C-NMR-Spektren von Toonaphyllin und 6-Hydroxytoonaphyllin 78
4.4.7 Auswirkungen der Substitution an C-6 auf die chemische Verschiebung der α-, β- und γ- C-Atome 78
4.4.8 Die Massenspektren der Toonaphylline 83

4.5 Strukturaufklärung von 6-Acetoxy-12-deacetoxy-toonacilin (14) 85
4.5.1 Massebestimmung, Summenformel und Schmelzpunkt ... 85
4.5.2 Das IR-Spektrum von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoona-cilin 86
4.5.3 Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 6-Acetoxy-12-deacetoxy-toonacilin 87
4.5.4 Absicherung der Zuordnungen von 5-H und 9-H 91
4.5.5 Das ^{13}C-NMR-Spektrum von Acetoxy-12-deacetoxy-toonacilin 92

5. Prüfung der isolierten Triterpenoide auf fraß-hemmende und metamorphosebeeinflussende Wirkung .. 97
5.1 Testmethode 97
5.2 Testergebnisse 97

6. Zusammenfassung 100

EXPERIMENTELLER TEIL

7.1 Verwendete Geräte 103
7.2 Pflanzenmaterial 104
7.3 Extraktion 104
7.4 Verteilungs-Chromatographie 105
7.5 Vorfraktionierung an 960 g-Säule 105
7.6 Isolierung von 6-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron 105
7.7 Isolierung von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin ..106
7.8 Isolierung von 11α-i-Butyroxyneotrichilenon 107
7.9 Isolierung der Toonaphylline 107
7.10 Angaben zur Dünnschichtchromatographie 109

8. Literaturverzeichnis 110

T H E O R E T I S C H E R T E I L

1. EINLEITUNG

Die großen Erfolge der synthetischen Chemie in der jüngeren Vergangenheit ließen die Beschäftigung mit Naturstoffen nur wenig attraktiv erscheinen. Seit wenigen Jahren und erst allmählich gewinnt die Naturstoffchemie wieder größeres Interesse. Das liegt zwar einerseits in einem gewissen Zeittrend, andererseits erscheint es aber auch nur naheliegend, Beobachtungen im Bereich der Volksmedizin oder des natürlichen Pflanzenschutzes zum Anlaß gezielter Suche nach den dafür verantwortlichen Wirkstoffen oder sogar Wirkungszusammenhängen zu nehmen, wobei erweiterte Kenntnisse darüber neue Anstöße für die synthetische Chemie vermitteln können.

So gilt der in Südostasien weit verbreitete Neem-Baum (Azadirachta indica) bei der dortigen Bevölkerung als alte Heilpflanze mit vielfältigen pharmakologischen Wirkungen[1]. Pflanzenstengel werden wegen ihrer antiseptischen Eigenschaften gekaut, Tees gegen Fieber und Übelkeit getrunken, sogar gegen Malaria sollen Extrakte wirksam sein.

Isolierte triterpenoide Inhaltsstoffe, Sapelin A und B, haben sich in Tests gegen malignes Zellwachstum aktiv erwiesen[2].

Als Reaktion auf Umwelteinflüsse entwickeln Pflanzen sekundäre Inhaltsstoffe, mit deren Hilfe sie sich beispielsweise gegen Schädlinge zur Wehr setzen. Die Wirkung dieser sogenannten Allelochemics kann nur vertreibend bzw. abschreckend oder bei Aufnahme durch die Schädlinge toxisch (allelopathisch) wirken[3].

Gegen Nematoden wurden in Indien "margosa cakes" (Margosa = Azadirachta indica) auf den Boden ausgebracht[3,4]. Als hierbei wirksame Substanz konnte unter anderem Nimbidin erkannt werden.

Von Insekten durch Fraß aufgenommene Pflanzeninhaltsstoffe bewirken häufig Fehlentwicklungen bei deren Fortpflanzung. Stark zurückgehende Gelegezahlen sind eine mögliche Folge, ein anderer Effekt beruht auf einer Störung des Metamorphoseablaufs.

Diese nur kurze und doch beeindruckende Aufzählung unterschiedlicher Wirkungsweisen konnte bei umfangreichen Untersuchungen mit Azadirachta indica beobachtet werden. Aber auch bei anderen ebenfalls zur Familie der Meliaceen gehörenden Pflanzen, bei Melia azedarach[5], Toona ciliata[6] und Toona sureni[7] wurden zahlreiche Inhaltsstoffe isoliert, die bei Fraßtests mit dem mexikanischen Bohnenkäfer Epilachna varivestis Antifeeding-Aktivität bewiesen.

Über diese eher direkt verwertbaren Ergebnisse hinaus bietet eine systematische Isolierung von Wirkstoffen und Begleitkomponenten auch die Möglichkeit, biogenetische Zusammenhänge zu erschließen.

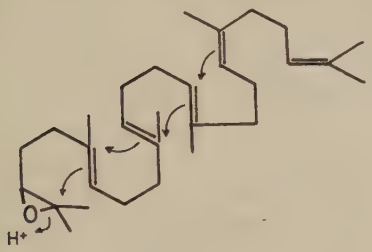
Ziel dieser Arbeit war die Isolierung und Strukturaufklärung weiterer biologisch aktiver Inhaltsstoffe von Toona ciliata var. australis. Zum Test auf eventuelle fraßhemmende und metamorphosebeeinflussende Wirkung wurden als Versuchstiere Larven von Epilachna varivestis gewählt.

2. ANMERKUNGEN ZUR BIOGENESE

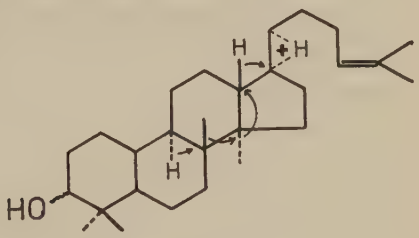
Bezug zu den hier beschriebenen neuen Triterpenoiden

Als Schlüsselverbindung der meisten polyterpenoiden Inhaltsstoffe von Meliaceen, Cneoraceen, Rutaceen und Simarubaceen kann das 3-(α- bzw. β-) Hydroxytirucalla-7,24-dien betrachtet werden[8].

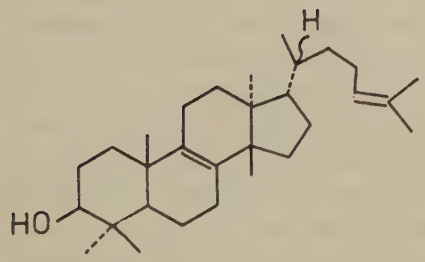
Man gelangt dazu ausgehend vom Squalenepoxid (1), das entsprechend seiner sterischen Anordnung grundsätzlich unterschiedliche protoneninitiierte Cyclisierungen[9] eingehen



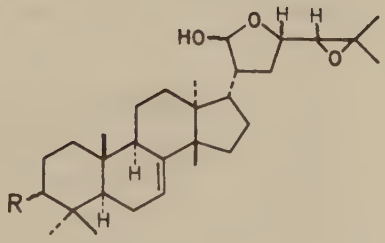
(1)



(2)



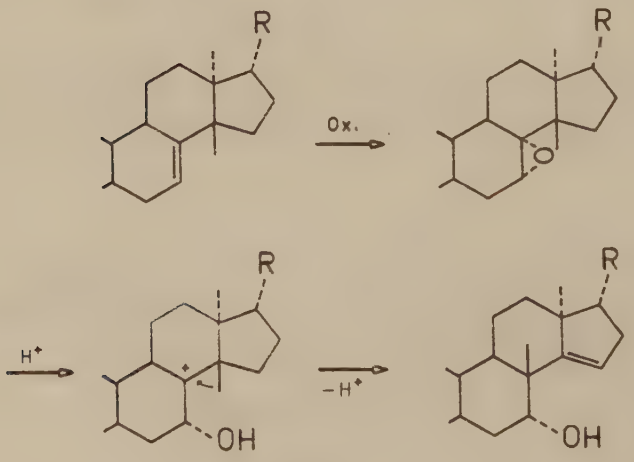
(3)



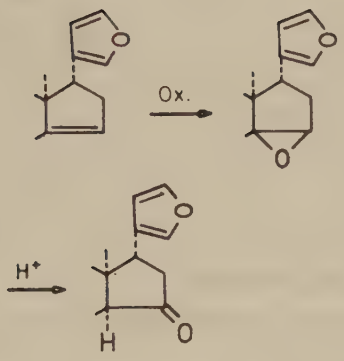
(4)

kann. Sie führen im einen Fall zum Lanosterol und weiter zu anderen Steroidverbindungen, in einer anderen Reihe ergeben sich Triterpene, die vor allem als Inhaltsstoffe von Pflanzen auftreten. Cyclisierung in einem enzymatischen Prozeß in der Sessel-Sessel-Boot-Konformation[10] führt über die kationische Zwischenstufe (2) zum Tirucallol (3) (bzw. zum 20H β-Isomeren Euphol).

Halsall und Mitarbeitern gelang u.a. mit Turreanthin (4) die Isolierung solcher frühen Stufen von Triterpenoiden[11]. Sie führten auch in vitro die Oxidation zum 7,8-Epoxid aus und lösten durch nachfolgende Ringöffnung die Methylwanderung von C-14 nach C-8 (sog. Apo-Rearrangement) unter Ausbildung der 14,15-Doppelbindung aus[12] (Schema 1).



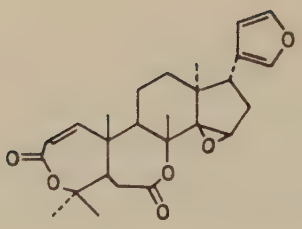
Schema 1: Epoxidierung und Apo-Rearrangement



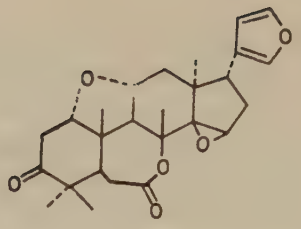
Schema 2: Epoxidierung und Ringöffnung zur 15-Ketofunktion

Die Positionen der wichtigen funktionellen Gruppen, die Sauerstoffatome an C-3 und C-7 und die 14,15-Doppelbindung sind demnach vermutlich biogenetischen Ursprungs. Die folgenden Reaktionsschritte sind vorwiegend Oxidationen. So ist Oxiranbildung an Position 14,15 und Weiterreaktion zur 15-Keto-Verbindung[13] (Schema 2) der denkbare Ablauf zum später beschriebenen 11α-i-Butyroxyneotrichilenon.

Durch einfache Oxidation der 7-α-Hydroxygruppe entsteht die 7-Ketofunktion. Danach erfolgt in einer Art Baeyer-Villiger-Reaktion[14] die Erweiterung des B-Ringes unter Ausbildung eines ε-Lactons. Beweise für die Existenz solcher interessanter Zwischenstufen konnten gerade auch in diesem Arbeitskreis erbracht werden. K. Kypke[7,15] isolierte aus Toona sureni das A/B-Dilacton Surenolacton (5) und W. Grimminger[6,16] gelang es, aus Blätter-Extrakten von Toona ciliata das B-Ring-Lacton Toonafolin (6) zu erhalten.



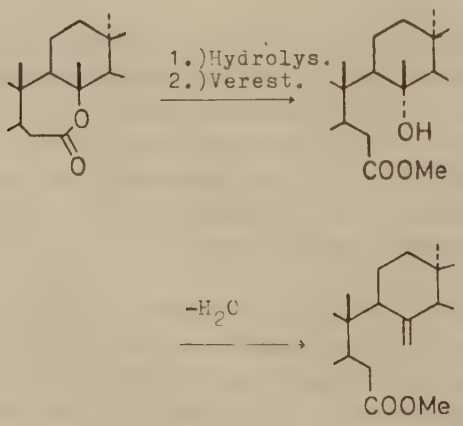
(5)



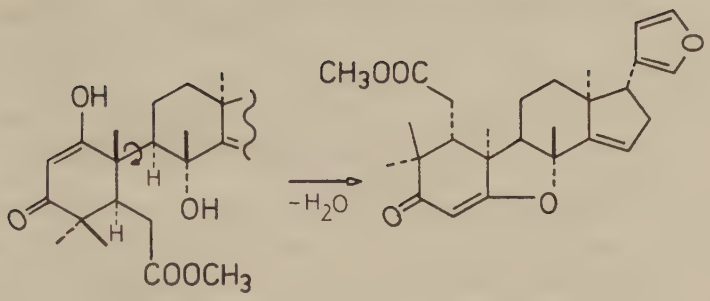
(6)

Wie leicht vorstellbar ist, stellt die Lactonstruktur des Toonafolins die Vorstufe ebenen neuen 7,8-seco-Tetranortriterpenoide dar.

Hydrolyse des ε-Lactons und Veresterung mit Methanol liefert die tertiäre OH-Gruppe an C-8 und den Methylester an C-7, durch anschließende Wasserabspaltung geht die Methylgruppe 30-H in die Exomethylengruppe über[17] (Schema 3).



Schema 3: Öffnung des Lactonringes zur 7,8-seco-Verbindung und Bildung der Exomethylengruppe an C-8



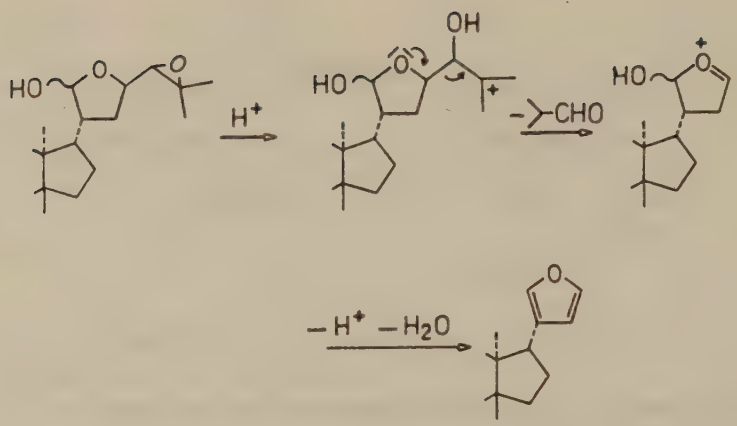
(7)

Schema 4: Möglicher Biogeneseschritt bei der Bildung von Tricoccin-S_{43} (7)

Von der Stufe der Lactonöffnung ausgehend könnte eine Weiterreaktion nach Drehung um die C-9/C-10-Bindung (Schema 4) auch Inhaltsstoffe liefern, wie sie von D. Trautmann vorhergesagt und von B. Epe und U. Oelbermann als Tricoccin-S_{19} bzw. -S_{43} (7) (die beiden Tricoccine unterscheiden sich in ihren Seitenketten) tatsächlich gefunden wurden[18].

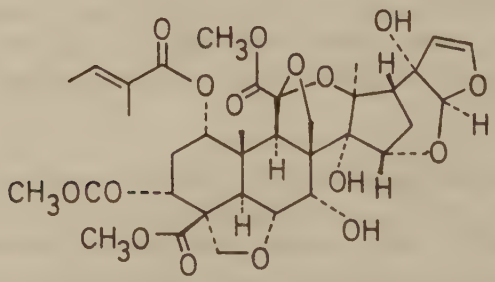
Der oxidative Abbau der C-17-Seitenkette unter Verlust von vier C-Atomen zur Tetranorverbindung läßt sich ebenfalls gut am schon erwähnten Beispiel des Turreanthins zeigen[12a]. Man gelangt dabei zum β-substituierten α-ständigen Furanring, wie er auch bei allen nachfolgend beschriebenen neuen Tetranortriterpenoiden gefunden wurde. Der Abbau läßt sich gemäß Schema 5 veranschaulichen[19].

Mit den beschriebenen Reaktionen der Oxiran- und Lactonbildung oder auch der Bildung von gesättigten und α,β-ungesättigten Ketonen sind die Oxidationsmöglichkeiten der Terpenoide noch lange nicht erschöpft, auch wenn diese Reaktionen vorherrschend und im Labor zumeist gut nachvollziehbar sind. Darüberhinaus werden auch nicht funktionalisierte Positionen, sogar anguläre Methylgruppen, oxidativ angegriffen.



Schema 5: Oxidativer Abbau der Seitenkette zum Furanring

Mit dem Azadirachtin (8)[20] wurde ein solcher Vertreter eines besonders hoch oxidierten Terpenoids gefunden. Wegen seiner ausgeprägten Antifeeding-Aktivität stellt es einen der zur Zeit bekanntesten Inhaltsstoffe von Meliaceen dar und erwies sich als interessante Aufgabe für die Strukturaufklärung.



(8)

3. ISOLIERUNG VON TRITERPENOIDEN AUS DEN BLÄTTERN VON TOONA CILIATA

3.1 Herkunft des Pflanzenmaterials

Die Blätter wurden im Oktober 1976 bei Brisbane/Australien gesammelt und dort luftgetrocknet[21]. Sie wurden anschließend in Jute-Säcke verpackt und in einem trockenen Raum bei Raumtemperatur bis zum Zeitpunkt der Weiterverarbeitung gelagert.

3.2 Vergleich von Ether- und Acetonextrakt

In einem Vorversuch wurden jeweils 300 g fein gemahlene Blätter mit Ether bzw. Aceton extrahiert. Die Etherextraktion wurde 24 Stunden im Soxhlet-Verfahren durchgeführt, während bei der Aceton-Extraktion viermal mit je 1.5 Liter Lösungsmittel fünf Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach die vier Extrakte vereinigt wurden. Die Aufarbeitung erfolgte für beide Verfahren gleich. Zur Abtrennung von unpolaren Anteilen wurde zwischen MeOH/Petrolether verteilt, die Abtrennung von stark polaren Komponenten erfolgte durch Verteilen zwischen Essigester/H_2O. Die so vorgereinigten Extrakte wurden durch Gradient-Elution an Kieselgel Si 60 grob getrennt und die einzelnen Fraktionen auf einer Dünnschichtplatte aufgetragen. Der Vergleich der entwickelten Platten zeigte, daß die aus den zwei unterschiedlichen Extraktionsmethoden gewonnenen Fraktionen gute Übereinstimmung aufwiesen. Für die eigentliche Extraktion wurde dann zugunsten des kontinuierlich verlaufenden Soxhlet-Verfahrens entschieden, zumal auch davon ausgegangen werden konnte, daß die thermische Belastung der extrahierten Inhaltsstoffe im tiefsiedenden Lösungsmittel (Ether) gering blieb und damit eine schonende Behandlung gewährleistet war.

3.3 Etherextraktion und Vorreinigung des Extrakts

Etwa 8 kg getrocknete Blätter werden in einer Brabender Heumühle sehr fein gemahlen und in drei Portionen zu je 2.4 kg 36 Stunden lang mit Ether nach dem Soxhlet-Verfahren extrahiert.

Nach Abziehen des Lösungsmittels am Rotations-Verdampfer wird als erste Reinigungsstufe zur Abtrennung von Wachsen, Fetten und anderen unpolaren Anteilen zwischen Petrolether und Methanol verteilt. Zur besseren Phasentrennung werden dem Methanol ca. 5 % H_2O zugesetzt. Nach dreimaligem Ausschütteln befinden sich auch die meisten Blattfarbstoffe in der unpolaren Phase, die verworfen wird. In der zweiten Stufe werden wasserlösliche stark polare Anteile wie z.B. Glycoside durch Verteilen zwischen EE/H_2O entfernt. Von dem so vorgereinigten Extrakt verbleiben nach Abziehen des Essigesters ca. 31 g braune, sehr zähe Masse pro Soxhlet-Füllung.

Die erste Auftrennung erfolgte an Kieselgel Si 60. Als Säule wurde eine geschlossene mit 950 g Kieselgel der Korngrößenverteilung 40-63 µ gefüllte Glassäule verwendet und mit einem Stufengradienten von Petrolether und Essigester, beginnend mit der Zusammensetzung PE/EE 9/1, chromatographiert. Zunächst werden 5 Vorfraktionen gesammelt, die noch viel Wachse und Fette enthalten. Die folgenden zwölf Fraktionen liefern bei steigendem Essigesteranteil im Eluenten Terpenoide. Von diesen werden die Fraktionen 5, 6, 7 und 11 weiter aufgetrennt.

3.4 Isolierung von 6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron

Aus einer methanolischen Lösung der Fraktion 5, die nahezu als Reinfraktion erhalten werden konnte, werden 410 mg 6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron auskristallisiert. Für die Herstellung von Spektren wird ein Teil davon erneut an einer Hochleistungssäule chromatographiert und in MeOH umkristallisiert.

3.5 Isolierung von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin und 11α-i-Butyroxyneotrichilenon

Die weitere Auftrennung der Fraktionen 6 und 7 erfolgte zunächst wieder an einer Kieselgel-Säule durch HPLC mit dem binären Eluenten Petrolether/Essigester im Verhältnis 7 : 3. Nachfolgende Reinigungsschritte werden durch Chromatographieren an LiChroprep RP 18 vorgenommen, wodurch sich eine völlige Umkehrung des Retentionsverhaltens erzielen läßt. Hierbei dienen Methanol/H_2O-Gemische als Fließmittel.

Zum Schluß werden die Reinsubstanzen aus Methanol kristallisiert, dabei werden 135 mg 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin und 115 mg 11α-i-Butyroxyneotrichilenon erhalten.

3.6 Trennung der Toonaphylline

Die Trennung der Toonaphylline aus Fraktion 11 wird ebenfalls durch wechselweise Verwendung von Säulen, gepackt mit Kieselgel, und solchen, gepackt mit modifiziertem Kieselgel, vorgenommen. Dabei werden die Fließmittel Petrolether/Essigester im Verhältnis 6 : 4 und 55 : 45 und Methanol/H_2O im Verhältnis 70 : 30 und 65 : 35 verwendet.

Bei dieser Vorgehensweise lassen sich vor allem mitgeschleppte stärker polare Verunreinigungen gut entfernen. Sie werden bei der Trennung an RP 18 - Material viel früher als die gewünschten Substanzen eluiert und dadurch zuverlässig abgetrennt. Allerdings können sich infolge des hohen Wasseranteils von 35 % auch Schwierigkeiten bei der Trennung dann einstellen, wenn die Substanzen auf der Trennsäule auskristallisieren. Starke Peakverbreiterung oder gar Verstopfung der Säule sind mögliche Folgen. Aus diesem Grund wurde teilweise auf Nitriloberflächenmodifiziertes Kieselgel ausgewichen, bei dem als mobile Phase PE/EE-Gemische verwendet werden können. Nach wie-

derholtem Chromatographieren und Kristallisation aus MeOH werden 40 mg Toonaphyllin, 12 mg 6-Hydroxytoonaphyllin und 95 mg 6-Acetoxytoonaphyllin gewonnen.

4. STRUKTURAUFKLÄRUNG DER SECHS NEUEN TETRANORTRITERPENOIDE

4.1 11α-i-Butyroxyneotrichilenon (9)

4.1.1 Summenformel und Schmelzpunkt

Die Hochauflösung des M^+-Peaks ergibt für 11α-i-Butyroxy-neotrichilenon die Masse m/e = 496.2824 (ber. 496.6464). Daraus errechnet sich die Summenformel $C_{30}H_{40}O_6$. Der Schmelzpunkt der aus MeOH kristallisierten Substanz beträgt 191 °C.

4.1.2 Das IR-Spektrum, Hinweise auf funktionelle Gruppen

Das IR-Spektrum weist bei 3480 cm^{-1} eine starke, breite OH-Bande auf. Im Carbonylbereich ist bei 1725 cm^{-1} eine starke Absorption für ein Ester-C=O und bei 1675 cm^{-1} die Absorption für ein α,β-ungesättigtes Keton zu sehen. Gesättigte 5-Ring-Ketone sind üblicherweise bei ca. 1725 cm^{-1} zu beobachten, die 15-Ketogruppe dürfte also im IR-Spektrum mit der sich stärker auswirkenden Estercarbonylgruppe zusammenfallen.

4.1.3 Das ^{1}H-NMR-Spektrum

Das ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb. 1) weist im Methylbereich sieben Signale auf, deren Integration für 21 Protonen steht. Da bei Terpenoiden mit vollständigem Gerüst typischerweise nur fünf Methylgruppen vorhanden sind, müssen die zwei weiteren entweder Bestandteil entsprechender Substituenten sein oder sie müssen in der noch nicht oxidierten Seitenkette des Ringes D untergebracht werden, es müßte sich also um ein Protolimonoid handeln. Letztere Möglichkeit scheidet aber aus, da die charakteristischen Signale bei 7.42, 7.29 und 6.31 ppm auf einen β-substituierten Furanring hinweisen, wie er durch Oxidation der Triter-

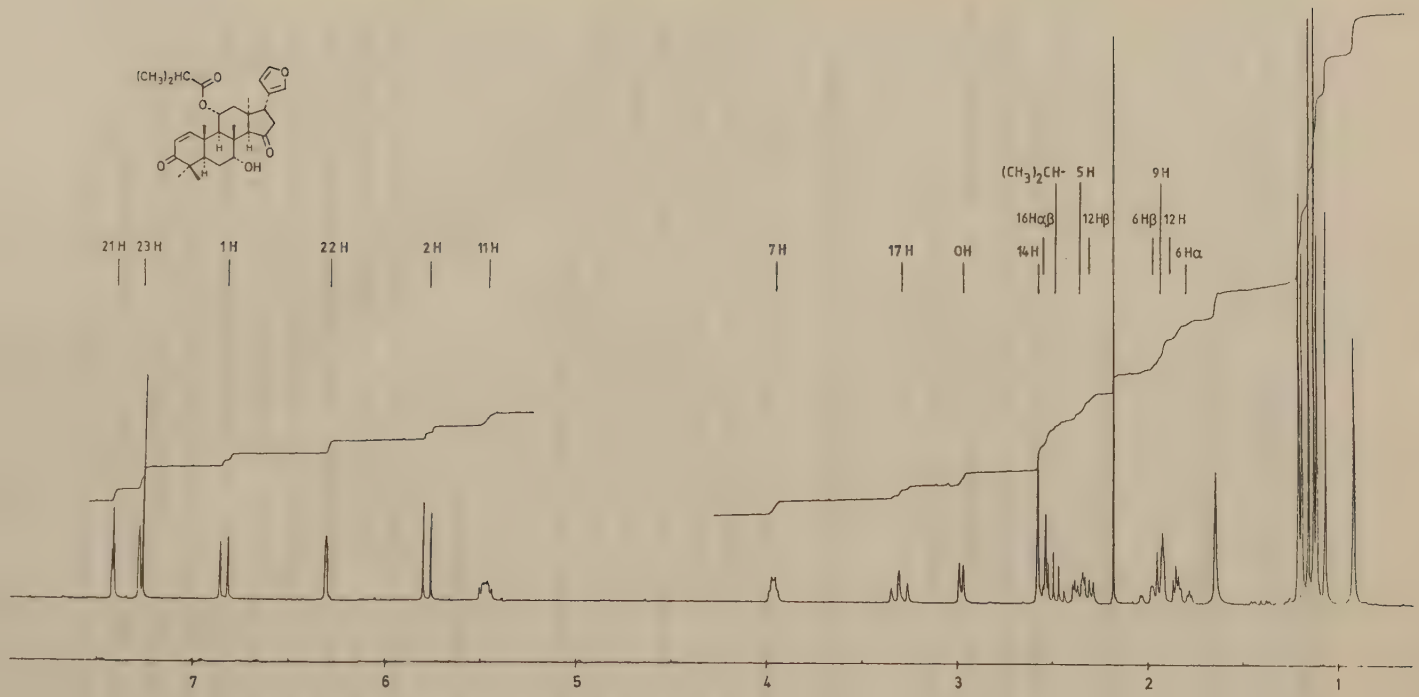


Abb. 1: 250 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum von 11α -i-Butyroxyneotrichilenon (9)

pen-Seitenkette und Verlust von vier C-Atomen allen Limonoiden eigen ist. Die zwei Dubletts (^3J = 10.3 Hz) bei 6.84 und 5.78 ppm gehören zu einem 6-Ring-Enonsystem, das vermutlich Ring A bildet. Durch D_2O-Austausch verschwindet das Dublett bei 2.97 ppm, gleichzeitig vereinfacht sich das Multiplett bei 3.96 ppm. Die Alkohol-Funktion muß folglich an einem sec. Kohlenstoffatom untergebracht sein, das seinerseits einer CH_2-Gruppierung benachbart ist. Die tiefe Lage des Multipletts bei 5.48 ppm deutet darauf hin, daß es sich hier um ein Methinproton handelt, das sich vermutlich in Nachbarschaft zu einer OCOR-Gruppe befindet, bei der es sich aber nicht wie häufig um eine Acetoxygruppe handeln kann (vgl. auch ^{13}C-Spektrum). Die Multiplizität entspricht drei Kopplungspartnern. Da laut Summenformel insgesamt sechs Sauerstoffe im Molekül vorhanden sind, kann das noch verbleibende O-Atom sinnvoll nur in Ring D untergebracht werden.

4.1.4 Die Konfiguration und Konformation des Ringes D

Durch Oxidation der 14,15-Doppelbindung ist bei Triterpenoiden häufig eine 14,15-Epoxy-Struktur im Ring D anzutreffen, die sich im ^1H-NMR-Spektrum durch ein auffällig breites Singulett des 15-H bei ca. 3.9 ppm bemerkbar macht. Ein solches Signal fehlt im betrachteten Fall, dafür weist das ^{13}C-NMR-Spektrum durch das Singulett bei 221 ppm deutlich auf einen gesättigten Carbonylkohlenstoff hin. Öffnet man bei Triterpenoiden den Epoxidring zur 15-Keto-Verbindung[22], tritt als Folge davon 17-H als breites Triplett bei ca. 3.5 ppm mit einer Kopplungskonstanten von ca. 10 Hz auf. Das vorliegende ^1H-Spektrum zeigt ein solches Triplett bei 3.3 ppm mit J = 11 Hz. Durch Homodecoupling-Experimente konnte das zugehörige Dublett bei 2.55 ppm als 16-H α/β identifiziert werden. Exakt über dem linken Ast dieses Dubletts liegt das Signal von 14-H (s, 2.57 ppm)(Abb.1a).

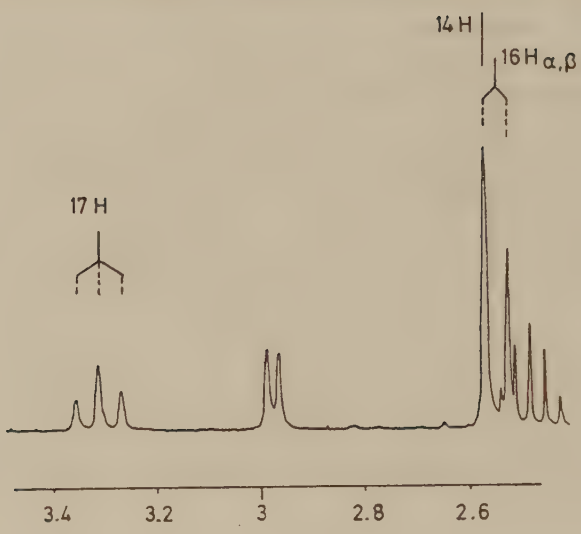


Abb.1a: ^{1}H-Resonanzen des Ringes D

Daß diese Zuordnung richtig ist, wird einerseits durch die Integration der Signale nahegelegt, den letzten Beweis dafür liefert aber das NOE-Spektrum, bei dem durch Einstrahlen auf 18-H das Singulett des 14-H eine starke Intensitätszunahme erfährt. Mit diesem Experiment ist gleichzeitig die α-Stellung von 14-H gezeigt, folglich sind die Ringe C und D cis-verknüpft.

Die für Ring D angeführten spektroskopischen Daten befinden sich auch in Übereinstimmung zu den von Cramer[23] beim 7-Acetylneotrichilenon gefundenen, die dort zusätzlich durch eine Röntgenstrukturanalyse abgesichert wurden.

4.1.5 Die stereochemischen Verhältnisse an den Ringen B und C

4.1.5.1 Das 4-Spinsystem 9-H, 11-H und 12-H α/β

Auf den zu Anfang erhaltenen Anhaltspunkten aufbauend sollen durch Homodecoupling-Experimente weitere Parameter der einzelnen Spinsysteme erhalten werden.
Zunächst wird auf das Multiplett (ddd) bei 5.48 ppm eingestrahlt. Dadurch vereinfacht sich das doppelte Dublett bei

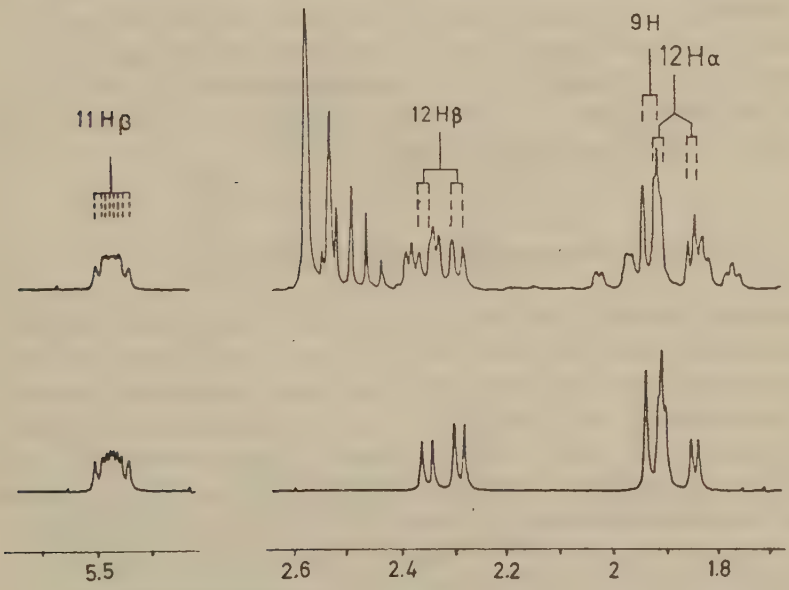


Abb. 2: AMXY-System 11-Hβ, 12-Hβ, 9-H, 12-Hα. Die obere Spur zeigt das experimentelle, die untere das simulierte Spektrum.

2.32 ppm und das bei 1.90 ppm zu jeweils einem einfachen Dublett mit der gemeinsamen Kopplungskonstanten von 15.2 Hz, aus dem Dublett bei 1.93 ppm wird ein scharfes Singulett. Damit sind die zu diesem AMXY-System (Abb. 2) gehörenden Signalgruppen gefunden. J = 15.2 Hz ist wegen ihres großen Betrages als Kopplungskonstante geminaler X- und Y-Protonen aufzufassen, ihre vicinalen Kopplungskonstanten zum A-Proton - ermittelt aus dem unentkoppelten Spektrum - haben die Beträge ^3J = 5.1 Hz und ^3J = 3.3 Hz. Der größere der beiden Werte charakterisiert häufig $^3J_{ae}$, wenn der elektronegative Substituent im cyclischen System equatoriale Position einnimmt. Das soll später mit Hilfe von NOE-Messungen überprüft werden. Wie aus den Mulitplizitäten hervorgeht, hat das M-Proton des AMXY-Systems nur A als Kopplungspartner, die relativ große Kopplungskonstante beträgt ^3J = 6.9 Hz. Wenn man auch hier von der Eigenschaft des Substituenten, $J_{vic.}$ zu reduzieren, ausgeht, kann ohne Widerspruch zu den zu erwartenden Werten aus der Karplus-Conroy-Kurve eine angenähert diaxiale Orientierung der beiden Protonen angenommen werden.

4.1.5.2 Die Konformationsänderung des Ringes C

Endgültige Klarheit über die Lage dieses AMXY-Systems liefern Messungen des Nuclear-Overhauser-Effekts. Strahlt man auf die Methylgruppe 30-H bzw. 19-H ein, ist eine Intensitätszunahme der Multipletts bei 5.48 und 2.32 ppm zu beobachten, sie sind damit als 11-Hβ und 12-Hβ aufzufassen. Dieses Experiment macht gleichzeitig deutlich, daß Ring C seine ursprünglich eingenommene Sesselkonformation, wie sie z.B. für 7-Acetylneotrichilenon nachgewiesen wurde[23], verändert haben muß. Die Signalintensitäten zeigen eine stärkere Dipol-Dipol-Wechselwirkung zwischen 11-H und 19-H, dagegen eine geringere zwischen 11-H und 30-H bei gleichzeitiger Beeinflussung von 12-Hβ und starker Wechselwirkung zu 17-Hβ . Die beobachteten Verhältnisse sind nur durch Übergang in eine Halbsessel-Form zu realisieren

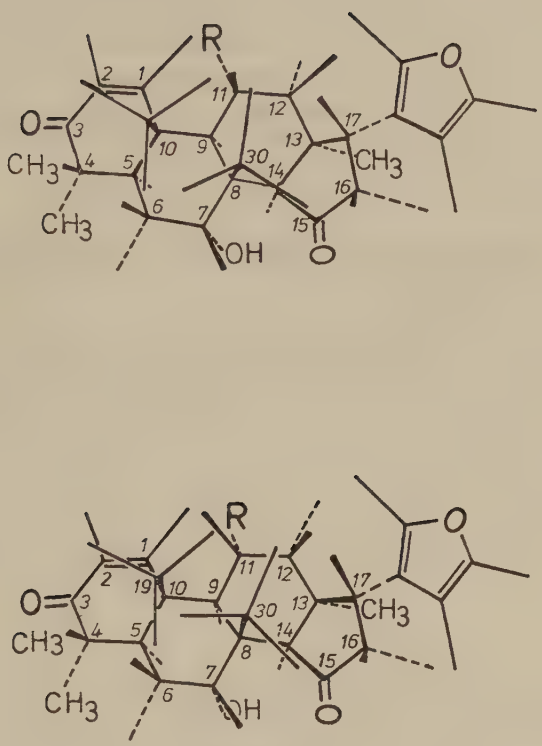


Abb. 3: Zwei Modelle des 11α-i-Butyroxyneotrichilenons in der Projektion. Das obere Bild zeigt die sterischen Verhältnisse bei Sesselkonformation, das untere bei Halbsesselkonformation des C-Ringes.
Abweichend von der üblichen Darstellungsweise bedeuten die offenen Striche H-Atome.

(Abb. 3). Die Erklärung dafür ist sicherlich im erhöhten Raumbedarf des 11α-Substituenten zu finden. Da die 11α-Position in der Sesselkonformation hier gleichbedeutend ist mit equatorialer Lage des Substituenten, bringt die Konformationsänderung diesen mehr in eine axiale Stellung und dadurch unter die Ringebene.

4.1.5.3 Das 4-Spin-System 5-H, 6-H α/β und 7-H und die Hydroxygruppe

Das nächste Entkopplungsexperiment soll die Verhältnisse an den C-Atomen 5 bis 7 klären (Abb. 4). Einstrahlen der Larmorfrequenz von 990.9 Hz (auf 7-H) vereinfacht das Multiplett bei

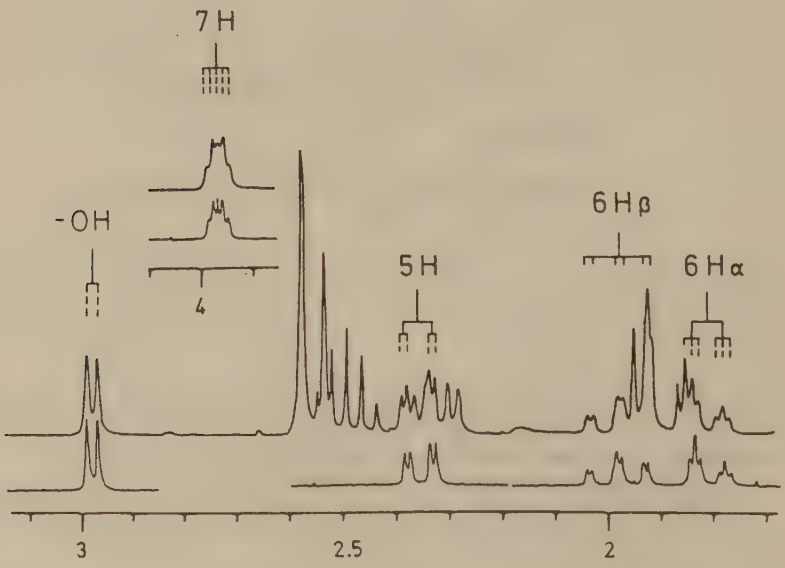


Abb. 4: 4-Spin-System 5-H, 6-Hα/β, 7-H und OH; die untere Spur zeigt das simulierte Spektrum

1.81 ppm zu einem Dublett von Dubletts, das bei 1.97 ppm zu einem breiten Triplett und aus dem schon durch D_2O-Austausch identifizierten Hydoxyl-Dublett bei 2.97 ppm wird ein Singulett.

Bei dem doppelten Dublett handelt es sich um 6-Hα , bei dem jetzt die Residualkopplungen zu 6-Hβ (^2J = 13.9 Hz) und zu dem durch dieses Entkopplungsexperiment unveränderten Signal (dd) von 5-Hα (^3J = 2.4 Hz) zu beobachten sind. Das Aufspaltungsbild von 6-Hα eines Dubletts von Tripletts resultiert also nicht aus der Kopplung mit zwei äquivalenten Protonen, sondern ist dadurch zu erklären, daß die beiden vicinalen Kopplungskonstanten zu 5-Hα (^3J = 2.4 Hz) und zu 7-Hβ (^3J = 2.6 Hz) nahezu gleich sind.

Es fehlt noch die Kopplung von 6-Hβ zu 7-Hβ . Sie wird aus dem unentkoppelten Spektrum bestimmt und beträgt ^3J = 2.4 Hz, was sehr gut dem Wert entspricht, wie er für J_{ae} bei Cyclohexansystemen mit axial-ständiger Hydroxylgruppe erwartet wird[24].

Mit der vollständigen Zuordnung der Protonen-Resonanzen der Ringe B und C ist auch ihre Verknüpfung geklärt. Da 9-H α-axiale und die Methylgruppe an C-8 β-axiale Position einnimmt, sind die Ringe trans verknüpft (ee).

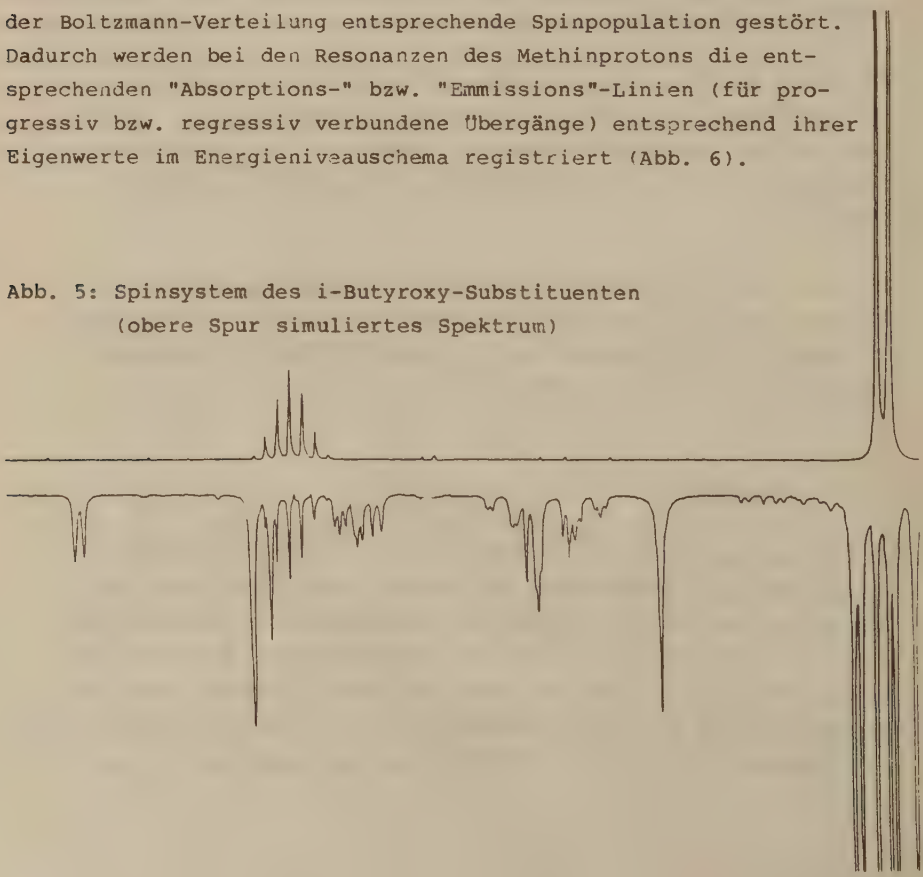
4.1.6 Der Ring A

Wie zu Anfang erwähnt, enthält Ring A das α,β-ungesättigte Keton. Da das β-H-Atom der Enon-Gruppe durch 19-H einen NOE erfährt, muß es an C-1 stehen, die Ketofunktion belegt also Position 3. Zu erwähnen ist noch die Lage der Ringe A und B zueinander. Wie bereits gezeigt steht 5-H axial, ergänzt durch NOE-Wechselwirkung der Methylgruppen ergibt sich für A/B equatorial/equatoriale (trans-) Verknüpfung.

4.1.7 Der 11α-Substituent

Nachdem sämtliche Gerüstprotonen zugeordnet sind, bleiben für den 11α-Substituenten noch die sieben Linien hoher Symmetrie bei 2.49 ppm und die zwei Signale im Methylbereich bei 1.14 ppm. Multiplizität, Linienabstand und Integral beweisen ein AX_6-System; bei den Methylsignalen handelt es sich also um zwei zum Dublett aufgespaltene magnetisch äquivalente Methylgruppen (Abb. 5). Dieser Dublett-Charakter wird auf interessante Weise bei einem der NOE-Experimente deutlich. Dort ist eine Art INDOR-Effekt aufgrund des Generellen Overhauser-Effekts[25] zu beobachten. Durch Einstrahlen bei 1.11 ppm (30-H) wird der rechte Ast des X-Teiles deutlich mitgetroffen und dadurch die der Boltzmann-Verteilung entsprechende Spinpopulation gestört. Dadurch werden bei den Resonanzen des Methinprotons die entsprechenden "Absorptions-" bzw. "Emmissions"-Linien (für progressiv bzw. regressiv verbundene Übergänge) entsprechend ihrer Eigenwerte im Energieniveauschema registriert (Abb. 6).

Abb. 5: Spinsystem des i-Butyroxy-Substituenten
(obere Spur simuliertes Spektrum)



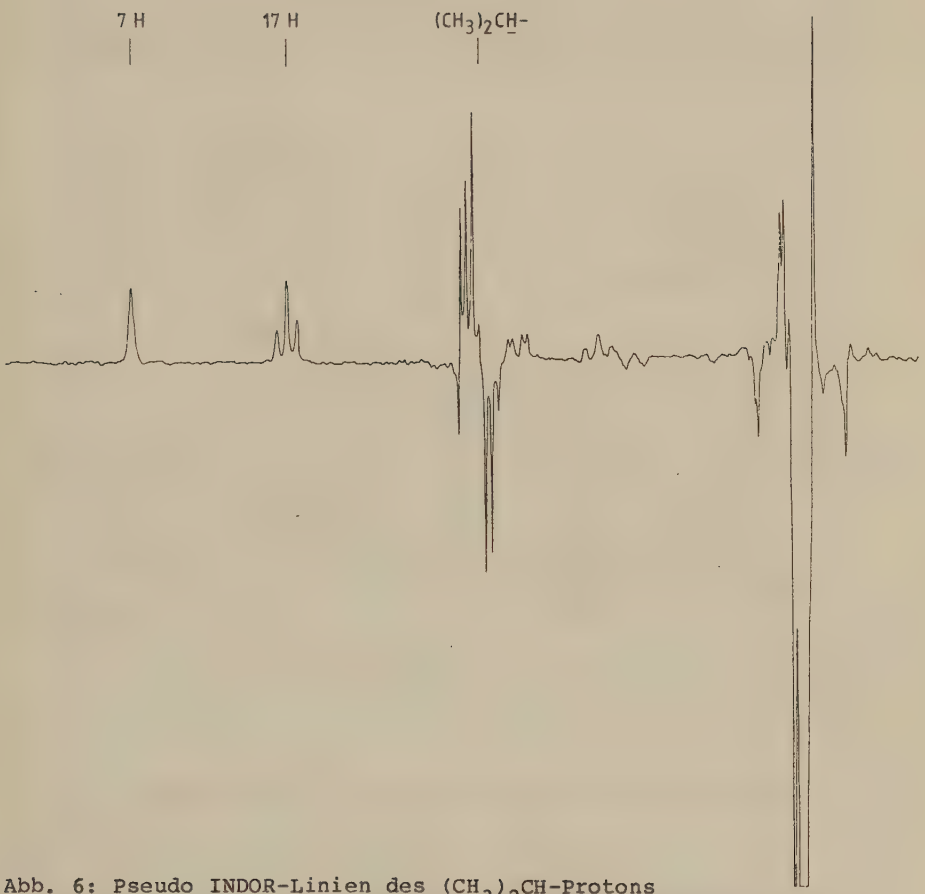


Abb. 6: Pseudo INDOR-Linien des $(CH_3)_2\underline{C}H$-Protons
durch unterschiedliche Sättigung des $(CH_3)_2$-Dubletts

4.1.8 Spektrensimulation

Der Bereich zwischen 2.6 und 1.7 ppm zeigt teilweise eine starke Überlagerung einzelner Spinsysteme (Abb. 7). Auch durch Zusatz von Benzol, dessen günstige Solvenseffekte bei Steroiduntersuchungen häufig ausgenützt werden, ließen sich die Multi-

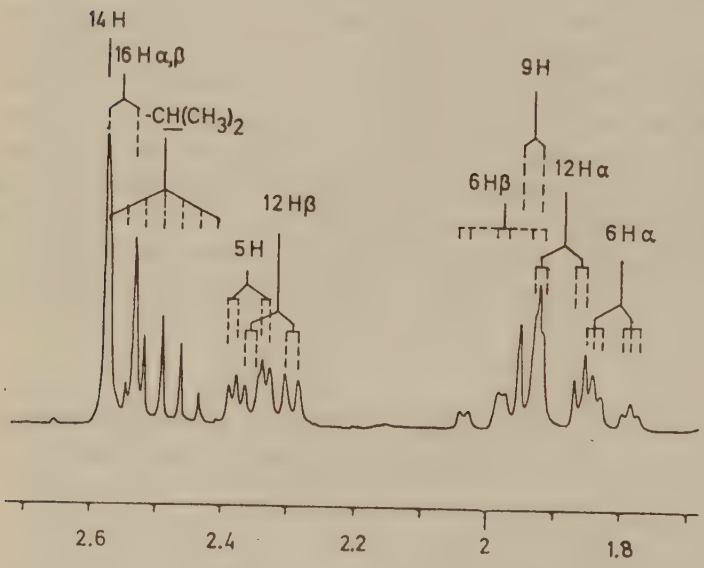


Abb. 7: Spinsysteme im Bereich zwischen 1.7 und 2.6 ppm

pletts nicht besser separieren. Nicht zuletzt deshalb erschien es geraten, die getroffenen Zuordnungen durch Computersimulation[26] zu verifizieren. Dabei wurden auf der Grundlage der aus dem experimentellen Spektrum ermittelten Parameter das theoretische Spektrum errechnet und durch Vergleich der Linien, wo nötig, die erste Korrektur vorgenommen. Dem schlossen sich

verschiedene Iterationscyclen bis zur guten Konvergenz gegen die richtige Lösung an, die sich in einer kleinen Fehlerquadratsumme und dem Betrachter in einer guten Übereinstimmung der Frequenzen und der relativen Intensitäten zeigt. Abbildung 8 stellt dem experimentellen Spektrum die berechneten Spinsysteme gegenüber.

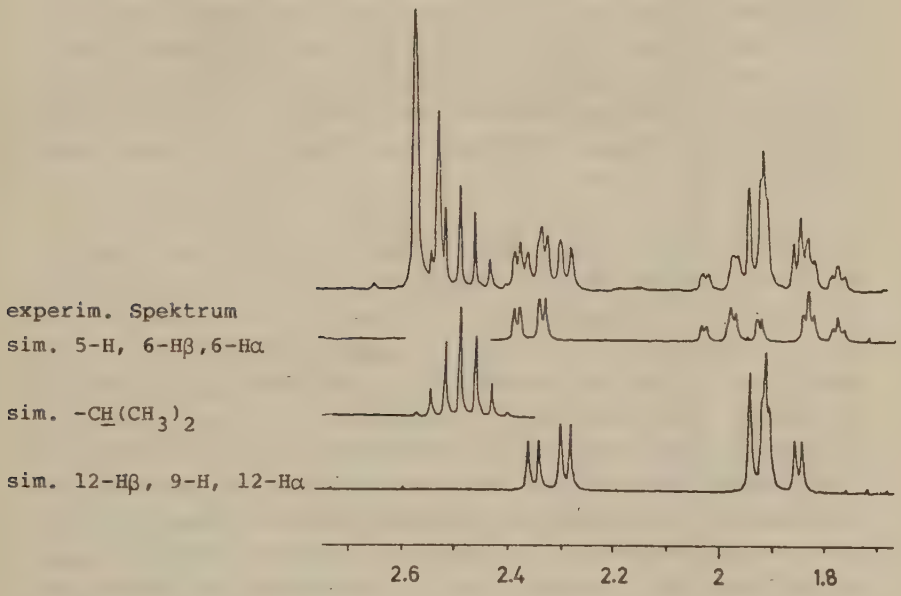


Abb. 8: Experimentelles Spektrum (obere Spur) und simulierte Spinsysteme

4.1.9 Interpretation der ^{13}C-Resonanzen

Im breitbandentkoppelten ^{13}C-NMR-Spektrum (Abb. 9) sind alle 30 Kohlenstoffsignale aufgelöst. Am einfachsten gelingt die Zuordnung der neun Resonanzen unterhalb 100 ppm, von denen bei Off-Resonanz fünf in Dubletts aufspalten. Es handelt sich dabei um die beiden Enon-Kohlenstoffe C-1 (157.80 ppm) und C-2 (125.19 ppm), sowie um drei C-Atome des Furanringes. Von den Singuletts ist das mit der größten chemischen Verschiebung (221.01 ppm) einem gesättigten Keton, also C-15, zuzuordnen, das bei 204.43 ppm dagegen dem ungesättigten Keton C-3. Für Estercarbonyle charakteristisch das Signal bei 176.42 ppm, zum substituierten β-Kohlenstoff des Furanrings (C-20) gehört dasjenige bei 122.77 ppm.

Die verbleibenden 21 Resonanzen liegen im Bereich zwischen ca. 70 und 20 ppm. Deutlich abgesetzt sind die beiden Linien bei 70 ppm, die aufgrund ihrer Lage den beiden Sauerstoff tragenden Kohlenstoffen C-11 und C-7 zugewiesen werden müssen. Um eine sichere Zuordnung dieser und der anderen Signale vornehmen zu können, wurde statt einer ganzen Reihe von selektiven Doppelresonanzexperimenten ein heteroskalar korreliertes (^{13}C-^{1}H-Spin-Spin- gekoppeltes) zweidimensionales (2D) NMR-Spektrum aufgenommen, bei dem die eine Frequenzachse die chemische Verschiebung der Protonen, die andere die chemische Verschiebung von Kohlenstoff-13 enthält. Über die bekannten Protonenresonanzen im Konturdiagramm wird auf die Kohlenstoffe geschlossen. Da sowohl die direkte Nachbarschaft als auch, für die Festlegung der quartären C, weiterreichende Einflüsse interessieren, müssen diese Untersuchungen wegen der großen Unterschiede von $^{1}J_{C-H}$ und $^{n}J_{C-H}$ mit n>1 in getrennten Experimenten erfolgen.

Im betrachteten Bereich konnten die Cross-Peaks für alle Wasserstoff tragenden Kohlenstoffatome sichtbar gemacht werden. Die Übersicht der jeweiligen Zuordnungen ist Tabelle 2 zu entnehmen.

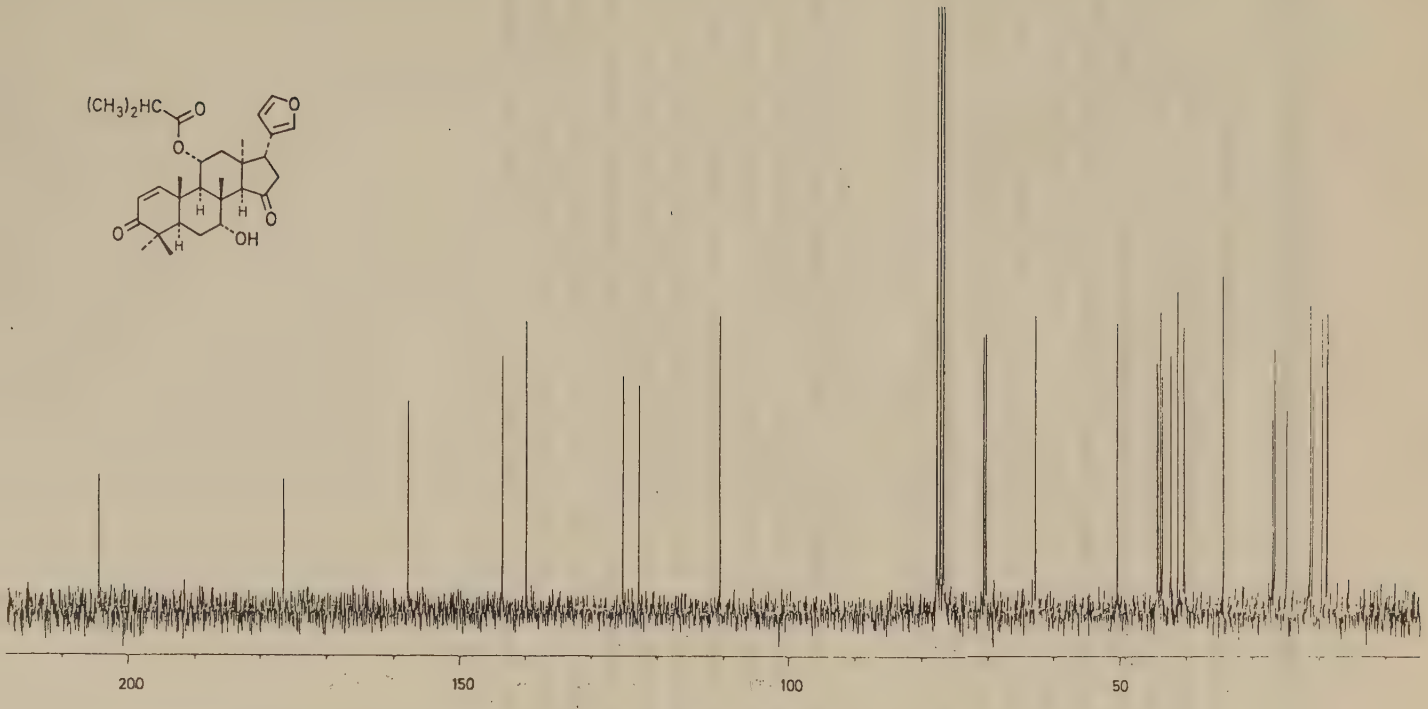


Abb. 9: ^{13}C-NMR-Spektrum von 11α-i-Butyroxyneotrichilenon (9)

4.1.10 Zuordnung der Methylgruppen und der quartären C-Atome

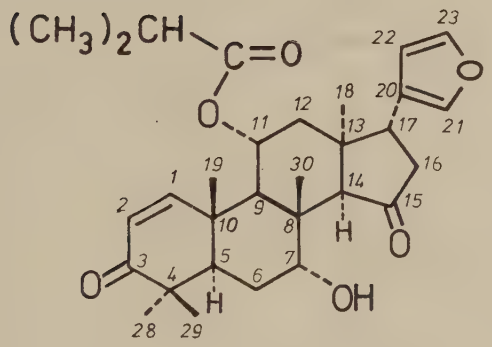
Nach vorherigem Festlegen ihrer "Reihenfolge" durch NOE-Messungen ist eine zweifelsfreie Korrelation der Methyl-C mit ihren Methylprotonen möglich. Darüberhinaus sind im Falle von C-19 und C-30 die weiterreichenden Kopplungen zu 5-H und 9-H und 14-H gut zu sehen. Diese Beobachtung kann als weiterer Beweis, jetzt durch Argumente der ^{13}C-Kopplung, für die stereochemischen Verhältnisse, nämlich die trans-diaxiale Orientierung der Kopplungspartner, gelten, da die Beträge von $^{3}J_{C-H}$ analoge Abhängigkeit vom dihedralen Winkel wie die vicinalen ^{1}H-^{1}H-Kopplungskonstanten zeigen[27].

Aufgrund ihrer über zwei Bindungen reichenden Kopplung sind den quartären Kohlenstoffen C-4, C-8, C-10 und C-13 die Resonanzen bei 44.34, 43.92, 40.44 und 41.38 zuzuweisen. So zeigt C-4 Cross-Resonanzen mit 5-H sowie mit 28-H und 29-H, wobei die beiden Methyl-Kreuzsignale deshalb so stark ausfallen, weil dicht unterhalb von C-4 das Signal von C-5 liegt, das mit den gleichen CH_3-Gruppen koppelt. Auch die nebeneinander liegenden Resonanzen von C-8 und C-17 besitzen eine starke gemeinsame Kopplung zu 14-H, aber nur C-8 kann noch zusätzlich mit 30-H korreliert werden. Zuletzt sei noch auf C-13 eingegangen, das sich durch drei Cross-Peaks zu 14-H, 17-H und 18-H besonders gut zu erkennen gibt.

4.1.11 Die Struktur des 11α-i-Butyroxyneotrichilenon (9)

Durch die vorangegangenen Interpretationen der Spektren ist für 11α-i-Butyroxyneotrichilenon die Struktur (9) bewiesen.

In Tabelle 1 sind die Zuordnungen der ^{1}H-NMR-Signale, in Tabelle 2 die Zuordnungen der ^{13}C-NMR-Signale aufgelistet.



(9)

Tabelle 1: ^{1}H-NMR-Daten des 11α-i-Butyroxyneotrichilenon (9)
(δ-Werte in ppm, J-Werte in Hz)

1-H	6.84	d	$^3J_{1/2}$ = 10.3			
2-H	5.78	d	$^3J_{2/1}$ = 10.3			
5-Hα	2.36	dd	$^3J_{5/6\alpha}$ = 2.3	$^3J_{5/6\beta}$ = 12.6		
6-Hα	1.81	m	^2J = 13.9	$^3J_{6\alpha/7\beta}$ = 2.6	$^3J_{6\alpha/5}$ = 2.3	
6-Hβ	1.97	m	^2J = 13.9	$^3J_{6\beta/7\beta}$ = 2.3	$^3J_{6\beta/5}$ = 12.6	
7-Hβ	3.96	m	$^3J_{7/OH}$ = 4.8	$^3J_{7/6\alpha}$ = 2.6		
			$^3J_{7/6\beta}$ = 2.3			
9-Hβ	1.93	d	$^3J_{9/11}$ = 6.9			
11-H	5.48	m	$^3J_{11/9}$ = 6.9	$^3J_{11/12\alpha}$ = 3.3		
			$^3J_{11/12\beta}$ = 5.1			
12-Hα	1.90	dd	^2J = 15.2	$^3J_{12\alpha/11}$ = 3.3		
12-Hβ	2.32	dd		$^3J_{12\beta/11}$ = 5.1		
14-H	2.57	s				
16-Hα 16-Hβ	2.55	d	$^3J_{16/17}$ = 10.9			
17-H	3.30	t	$^3J_{17/16}$ = 10.9			
21-H	7.42	m				
22-H	6.31	m				
23-H	7.29	m				
18-H	0.92	s				
19-H	1.20	s		OH 2.97	$^3J_{OH/7}$ = 4.8	
28-H	1.18	s		$(C\underline{H}_3)_2CHOCO-$ 1.14	d	
29-H	1.06	s			^3J = 7.0	
30-H	1.11	s		$(CH_3)_2C\underline{H}OCO-$ 2.49	m	

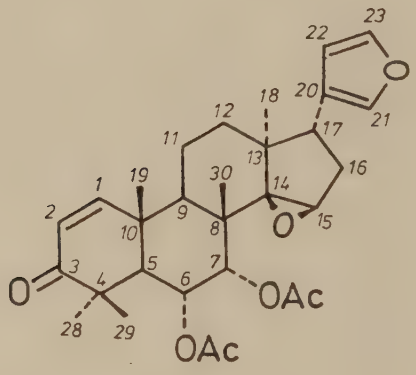
Tabelle 2: ^{13}C-NMR-Daten des 11α-i-Butyroxyneotrichilenon (9)
(δ-Werte in ppm)

C-1	175.80	(d)
C-2	125.19	(d)
C-3	204.43	(s)
C-4	44.34	(s)
C-5	44.47	(d)
C-6	24.96	(t)
C-7	70.22	(d)
C-8	43.92	(s)
C-9	50.47	(d)
C-10	40.44	(s)
C-11	70.54	(d)
C-12	40.39	(t)
C-13	41.38	(s)
C-14	62.71	(d)
C-15	221.01	(s)
C-16	42.41	(t)
C-17	43.66	(d)
C-18	27.0	(q)
C-19	19.57	(q)
C-20	122.77	(s)
C-21	139.81	(d)
C-22	110.46	(d)
C-23	143.46	(d)
C-28	26.72	(q)
C-29	21.35	(q)
C-30	21.01	(q)
COOR	176.43	(q)
$\underline{C}H(CH_3)_2$	34.58	(d)
$CH(\underline{C}H_3)_2$	18.8 u. 18.9	(q)

4.2 Strukturaufklärung von 6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron

4.2.1 Summenformel und Schmelzpunkt

In der Elementaranalyse[28] wurden 70.08 % C (ber. 70.62) und 7.12 % H (ber. 7.51) ermittelt, die Massefeinbestimmung durch Hochauflösung des M^+-Peaks ergibt m/e = 510.2613 (ber. 510.6290). Daraus folgt die Summenformel $C_{30}H_{38}O_7$. Der Schmelzpunkt des aus Methanol kristallisierten 6α-Acetoxy-14,15-Epoxyazadirons (10) beträgt 214 °C.



(10)

4.2.2 Das IR-Spektrum, Hinweise auf funktionelle Gruppen

Einen ersten Einblick in die Art der funktionellen Gruppen geben die beiden starken Banden bei 1745 cm^{-1} und 1670 cm^{-1}. Erstere spaltet leicht auf und charakterisiert Estercarbonyle, während die zweite auf ein α,β-ungesättigtes 6-Ring-Keton hin-

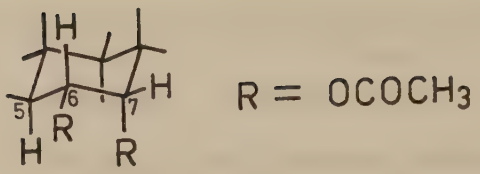
weist. Die scharfe Bande bei 870 cm^{-1} ist ein gutes Indiz für das Vorliegen eines Furanringes.

4.2.3 Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 6α-Acetoxy-14,15-epoxy-azadiron (Abb. 10)

Neben den bekannten Furansignalen und den zwei Dubletts für 1-H und 2-H sind unterhalb von 5 ppm noch zwei weitere Signalgruppen zu sehen. Sie sind Bestandteile eines AMX-Systems. Aufgrund ihrer chemischen Verschiebung muß es sich um die zu den beiden Acetoxy-Substituenten - deren CH_3-Signale sind bei 2.02 und 2.12 ppm zu beobachten - geminalen Protonen handeln. Da davon auszugehen ist, daß eine der beiden Acetoxygruppen sich in α-axialer Position an C-7 befindet[29] (vgl. Anmerkungen zur Biogenese), muß wegen der kleinen Kopplungskonstanten zwischen 7-H und 6-H (^3J = 2.5 Hz) die zweite 6α-equatoriale Lage einnehmen (Abb. 11). Der Betrag dieser a,e-Kopplung liegt damit zwischen den Werten, die für die ebenfalls 6α,7α-substituierten Terpenoide 6α-Acetoxyazadiron[30] und Surenin[31] angegeben werden.

Der X-Teil des Dreispin-Systems ist in dem Dublett bei 2.52 ppm (5-H) zu finden. Die große vicinale Kopplung ^3J = 12.5 Hz zu 6-Hβ (dd, 5.37 ppm) resultiert aus der trans diaxialen Orientierung der beiden Protonen zueinander.

Für die equatoriale Position des Substituenten an C-6 sprechen auch die chemischen Verschiebungen der Methylresonanzen, die alle weniger als 1.3 ppm betragen. Wie an Modellverbindungen gezeigt[32], bewirkt eine 6β-Acetoxygruppe einen Tieffeld-Shift von 19-H zu ca. 1.5 ppm.



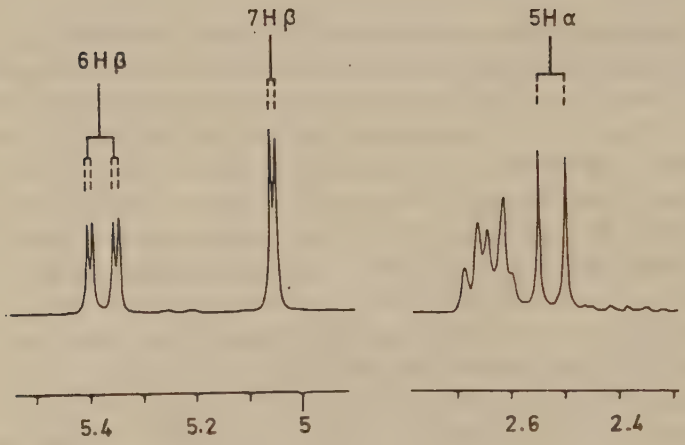


Abb. 11: AMX-System 6-Hβ, 7-Hβ und 5-Hα

16-Hα (1.60 ppm) und 16-Hβ (2.14 ppm) treten als Doppeldubletts mit der gemeinsamen (geminalen) Kopplungskonstanten ^{2}J = 13.2 Hz auf. Bei dem Signal von 16-Hβ ist noch eine Feinstruktur erkennbar, die auf eine schwache Kopplung (<1 Hz) zu 15-H (br. s., 3.45 ppm) zurückzuführen ist. Die beiden kleineren Kopplungskonstanten von 16-Hα/β ($^{3}J_{16\alpha/17\beta}$ = 10.9 Hz, $^{3}J_{16\beta/17\beta}$ = 6 Hz) erscheinen wieder in dem doppelten Dublett bei 2.64 ppm, das damit 17-Hβ zugeordnet werden kann (Abb. 12). Darunter liegt auch das Multiplett von 9-H (2.63 ppm), was u.a. durch Spin-Entkopplung bestätigt wird.

Abb. 10: 250 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum von 6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron (10)

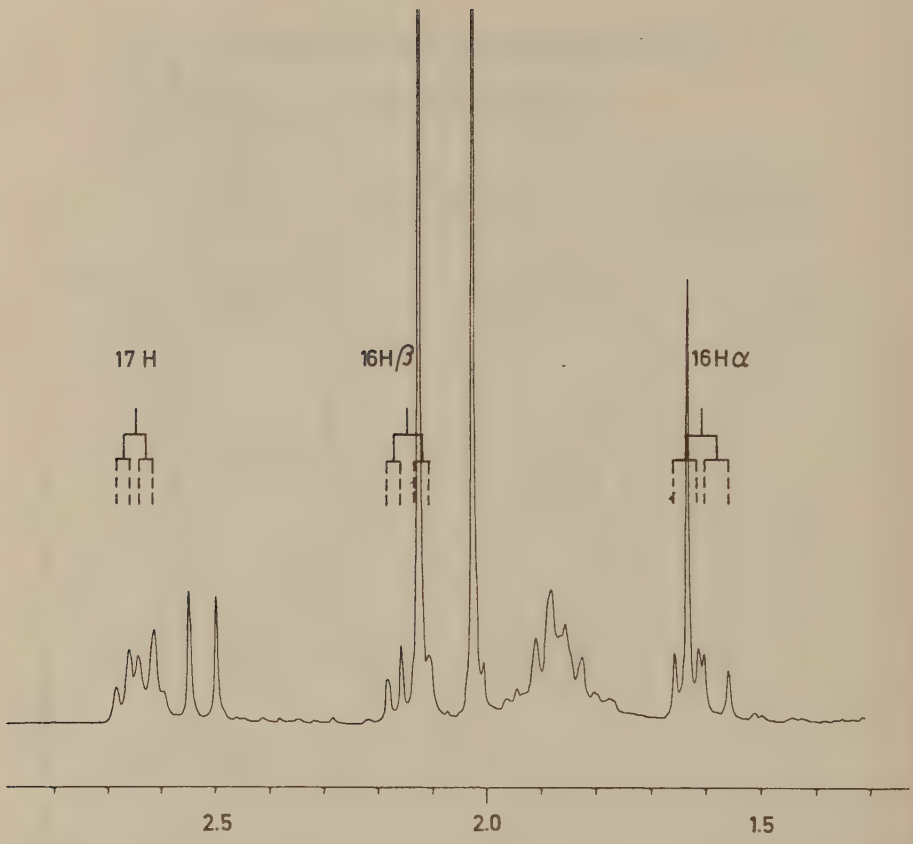


Abb. 12: Spin-System 17-H, 16-Hβ und 16-Hα

Letztere Entkopplung führt schließlich auch zu den Resonanzen von 11-Hα/β und 12-Hα/β . Sie bilden ein untereinander koppelndes System, bei dem alle vier Protonen nahezu gleiche chemische Verschiebung aufweisen.

In Tabelle 3 sind die getroffenen Zuordnungen vollständig zusammengestellt.

4.2.4 Zuordnung der angulären Methylgruppen durch NOE

Nachdem über die einzelnen Signale der Gerüstprotonen Klarheit besteht, können die Methylresonanzen durch Betrachtung ihrer dipolaren Kopplungseffekte (Abb. 13) identifiziert werden.

Da die Resonanzen von 29-H und 19-H sowie 30-H und 28-H jeweils einen Abstand von nur ca. 0.01 ppm voneinander aufweisen, läßt sich beim Einstrahlen des Zweitfeldes eine gewisse Sättigung auch bei Nachbarsignalen nicht verhindern. Trotzdem ist aufgrund der erheblichen Intensitätsunterschiede der Nuclear-Overhauser-Effekte eine zuverlässige Unterscheidung gewährleistet. Die beobachteten Intensitätszunahmen sind mit s = stark, m = mittel und w = schwach gekennzeichnet:

18-H	21-H, m,	22-H, m;	9-H, s;	
0.96 ppm	12-H, m;	16-H, s;		
29-H	6-H, s;			
1.17 ppm				
19-H	1-H, s;	2-H, w;	6-H, m;	11-H, w;
1.19 ppm				
30-H	6-H, s;	7-H, s;	5-H, w;	
1.24 ppm	11-H, w;	19-H, s;		
28-H	6-H, w;	7-H, w;	5-H, s;	
1.25 ppm				

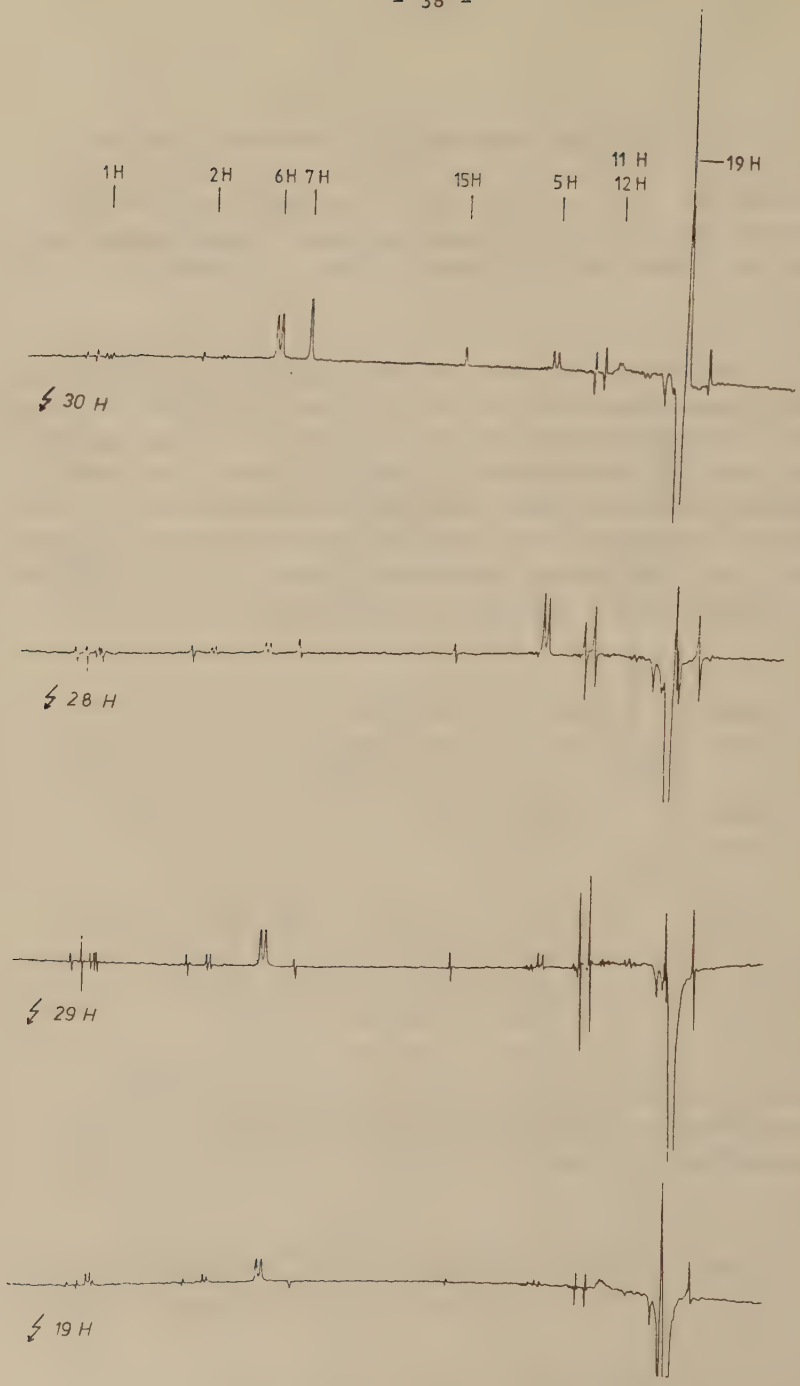


Abb. 13: NOE-Experimente am 6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron

4.2.5 ^{13}C-Zuordnungen von 6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron

Obwohl schon seit längerem Naturstoffe ähnlicher Strukturen[33] gefunden wurden, sind davon entweder keine ^{13}C-NMR-Spektren aufgenommen worden oder es blieben Unsicherheiten bei den Zuordnungen bestimmter ^{13}C-Signale bestehen. Das betrifft insbesondere die Zuordnungen von quartären Kohlenstoffen, bei denen man auf Long-Range-Entkopplung angewiesen ist und die Long-Range-Partner dabei teilweise die gleichen sind für verschiedene quartäre C-Atome, und die Zuordnung von angulären Methylgruppen, deren ^{1}H-Signale für eine Selektiventkopplung bisweilen zu dicht beieinander liegen oder deren ^{13}C-Signale sich im linienreichen Bereich um 20 ppm überlagern. In solchen Fällen bietet sich eine "Entzerrung" der ^{13}C-^{1}H-Kopplungen durch eine weitere Dimension mit Hilfe von zweidimensionalen ^{13}C-^{1}H-korrelierten Spektren an. Zunächst soll jedoch auf die aus dem breitband-entkoppelten Spektrum (Abb. 14) und dem Off-Resonance-Spektrum interpreitierbaren Resonanzen eingegangen werden.

Die Signale bei 204.54 (s), 157.57 (d) und 126.19 (d) ppm charakterisieren die Enon-Kohlenstoffe, die beiden ganz eng beieinanderliegenden Singuletts bei 169.98 und 169.89 ppm gehören zu den Carbonyl-Kohlenstoffen der Acetoxygruppen und die dann noch unterhalb 100 ppm verbleibenden drei Signale sind dem Furanring zuzuordnen (Abb. 15).

Die nächste Signalgruppe betrifft Kohlenstoffe, die ohne Beteiligung von Doppelbindungen an elektronegative Substituenten gebunden sind. Die vier dafür in Betracht kommenden sind die Acetoxy-Substituenten tragenden C-6 und C-7 und die beiden C-Atome 14 und 15 des Oxiranringes. Von den zwei letztgenannten erscheint C-14 als Singulett (72.79 ppm), und da der Epoxid-Sauerstoff einen weniger stark entschirmenden Einfluß ausübt als die Acetoxygruppen, kommt C-15 das Dublett bei 57.21 ppm zu.

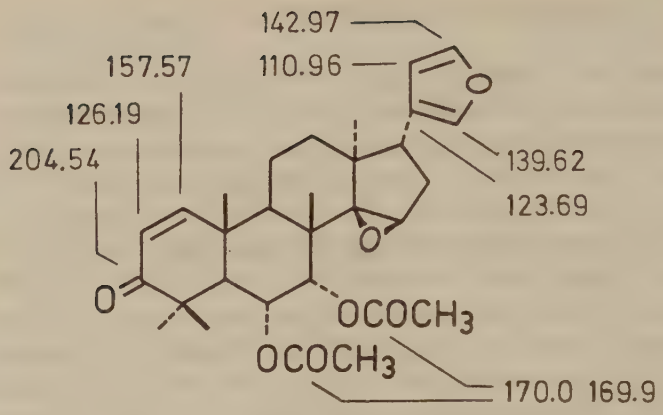


Abb. 15: ^{13}C-Resonanzen unterhalb 100 ppm

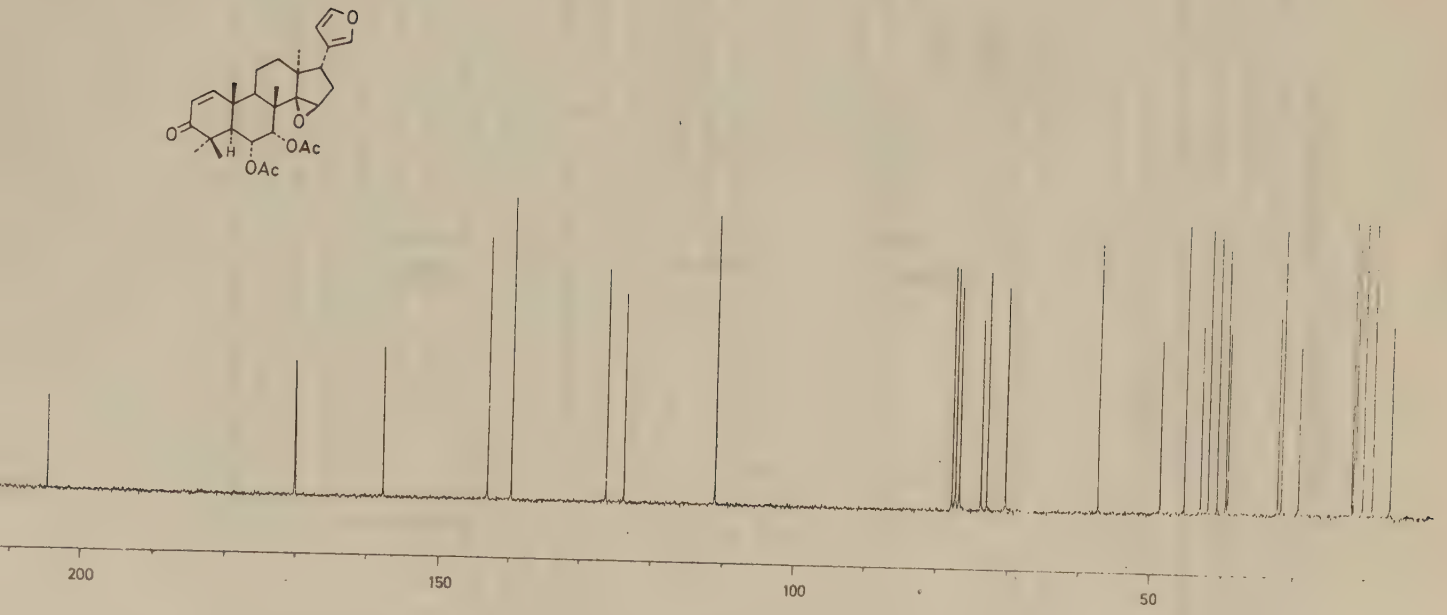


Abb. 14: ^{13}C-NMR-Spektrum von 6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron (10)

4.2.6 Die ^{13}C-Zuordnungen der Methylgruppen

Das auf Kopplungskonstanten >120 Hz opitmierte ^{13}C-^{1}H-korrelierte Spektrum bildet die Grundlage für die Zuordnung der angulären und der Acetyl-Methylgruppen (Abb. 16).

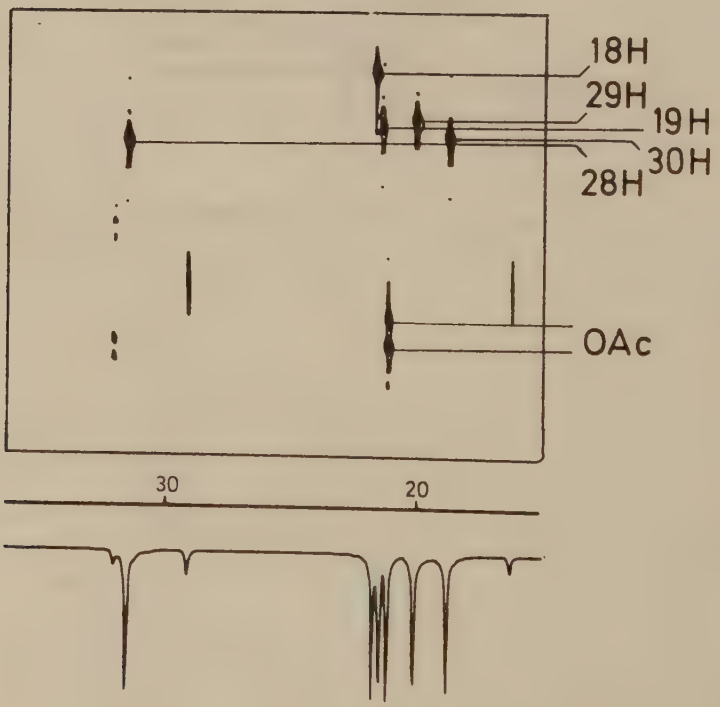
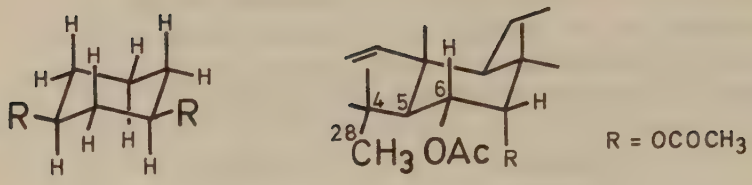


Abb. 16: ^{13}C-^{1}H-korreliertes Spektrum im Bereich der Methylresonanzen

Auf der Ordinate des gespreizten 2D-Spektrums werden die Methylgruppen in der Reihenfolge zunehmender chemischer Verschiebung, basierend auf den Nuclear-Overhauser-Experimenten festgelegt. Daraus resultiert folgende Zuordnung:

Chemische Verschiebung	C-Atom
31.63 ppm	C-28
21.53 ppm	C-19
21.22 ppm	$OCO\underline{C}H_3$
21.21 ppm	
20.21 ppm	C-29
18.88 ppm	C-30

Auffallend ist die starke Tieffeld-Lage des C-28. Bei zwei Naturstoffen, einem Apotirucallol- und einem Nimbinderivat[34] mit ähnlichen Verhältnissen an den Ringen A und B wurden ebenfalls für ein Methyl-Signal 31.6 ppm gefunden, ohne daß eine Zuordnung vorgenommen wurde. Shift-Effekte aufgrund von 1,3-diaxialer Wechselwirkung von Substituenten und Methylprotonen sind untersucht[32a,34] und bei 5 α-Steroiden wurden auch signifikante Tieffeld-Verschiebungen für Kohlenstoffe (C-19) bei Vorhandensein von syn-axialen Substituenten beobachtet[35]. An Modellbetrachtungen zeigt sich, daß 1,3-bis-equatoriale Substituenten, wie sie in Abb. 17 B gezeigt sind, ebenfalls parallele Orientierung einnehmen und dadurch sterische Verhältnisse eintreten, die 1,3-bis-axialen ähnlich sind, ganz im Gegensatz zu den 1,3-bis-equatorialen Substituenten in Abb. 17 A. Die Summe aus solcher sterischer Wechselwirkung und elektronischem δ-Effekt ergibt dann das bei tieferem Feld registrierte Signal.



A B

Abb. 17: Sterische Verhältnisse bei Substitution in 1,3-Stellung

4.2.7 Die Zuordnung von C-4, C-8, C-10 und C-13

In einem auf Kopplungsbeträge bis ca. 10 Hz optimierten ^{13}C-^{1}H-korrelierten Spektrum (Abb. 18) drücken sich die weiteren über zwei und drei Bindungen reichenden Nachbarschaftsverhältnisse der Kohlenstoffe aus. Es enthält damit auch die Informationen für die Zuordnung der quartären C-Atome. Kaum noch sichtbare Kopplung zeigt das Singulett bei 42.91 ppm mit 7-H und 9-H, aber einen sehr deutlichen Cross-Peak mit 30-H. Es handelt sich folglich um C-8. Ähnlich gestalten sich die Kopplungen von C-13 (41.85 ppm), das nur mit 18-H korreliert werden kann, Kopplungen mit 12-H$\alpha\beta$ und 17-H sind hier nicht mehr zu beobachten. Besondere Verhältnisse weist Ring A auf. Da die Kohlenstoffe der Enon-Gruppierung sp^2-hybridisiert sind, liegen mit Ausnahme von C-5 alle C-Atome des Ringes in einer Ebene (Abb. 19). Demzufolge nehmen sowohl C-4 als C-10 den für Kopplungen über drei Bindungen günstigsten 180°-Winkel zu 2-H ein.

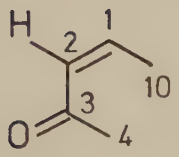


Abb. 19: In einer Ebene liegende Kohlenstoffatome des Ringes A

Die über die Doppelbindung erwartungsgemäß günstigeren Kopplungsvoraussetzungen lassen bei dem Signal bei 40.6 ppm zugunsten von C-10 entscheiden. In gleichem Sinne ist auch der kleinere Cross-Peak von C-10 im Bereich der Methylgruppen zu bewerten. Er rührt aus der Kopplung mit 19-H her, während C-4 (45.17 ppm) mit den Methylprotonen von 28-H und 29-H koppelt, was in dem länger gestreckten Kreuzsignal zum Ausdruck kommt.

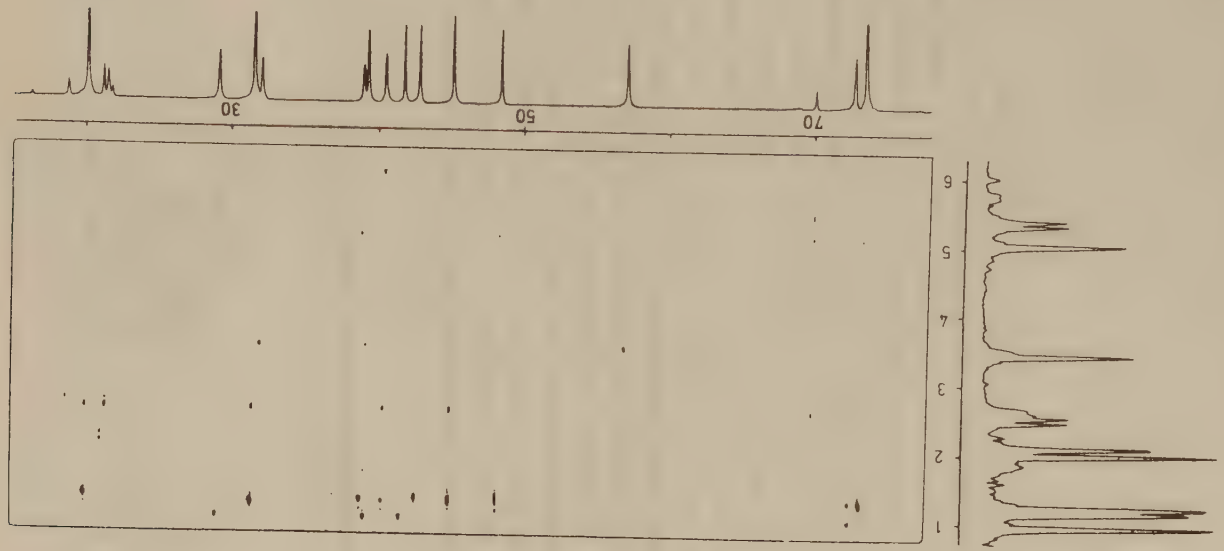


Abb. 18: ^{13}C-^{1}H-korreliertes Spektrum von 6-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron (10)

Tabelle 3: Zuordnung der ^{1}H-Resonanzen von 6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron (10) (δ-Werte in ppm, J-Werte in Hz)

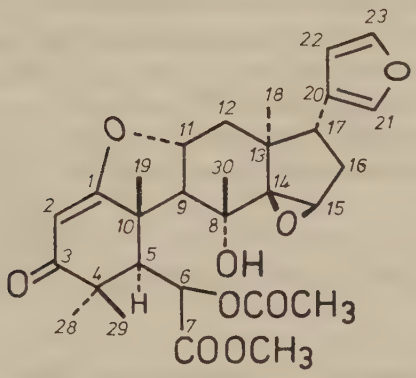
1-H	7.15	d	$^3J_{1/2}$ = 10.0	
2-H	5.94	d	$^3J_{2/1}$ = 10.0	
5-H	2.52	d	$^3J_{5/6}$ = 12.5	
6-Hβ	5.37	dd	$^3J_{6/5}$ = 12.5	$^3J_{6/7}$ = 2.4
7-Hβ	5.05	d	$^3J_{7/6}$ = 2.4	
9-H	2.36	m		
11-Hα, 11-Hβ, 12-Hα, 12-Hβ	von 1.98 bis 1.74			
15-H	3.45	b.s		
16-Hα	1.60	dd*	^2J = 13.2	$^3J_{16\alpha/17}$ = 10.9
16-Hβ	2.14	dd*	^2J = 13.2	$^3J_{16\beta/17}$ = 6.0
17-H	2.64	dd	$^3J_{17/16\alpha}$ = 10.9	$^3J_{17/16\beta}$ = 6.0
18-H	0.96	s		
19-H	1.19	s		
21-H	7.11	m		
22-H	6.17	m		
23-H	7.37	m		
28-H	1.25	s		
29-H	1.17	s		
30-H	1.24	s		
2x -OAc	2.12	s und 2.02	s	

* kleine Kopplung zu 15-H (kleiner als 1 Hz) unberücksichtigt

Tabelle 4: ^{13}C-NMR-Zuordnungen von
6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron (10)
(δ-Werte in ppm)

C-1	157.57	(d)	
C-2	126.19	(d)	
C-3	204.54	(s)	
C-4	45.17	(s)	
C-5	48.56	(d)	
C-6	70.17	(d)	
C-7	73.61	(d)	
C-8	42.91	(s)	
C-9	39.10	(d)	
C-10	40.60	(s)	
C-11	16.42	(t)	
C-12	29.24	(t)	
C-13	41.85	(t)	
C-14	72.79	(s)	
C-15	57.21	(d)	
C-16	32.19	(t)	
C-17	39.4	(d)	
C-18	21.8	(q)	
C-19	21.53	(q)	
C-20	123.69	(s)	
C-21	139.62	(d)	
C-22	110.96	(d)	
C-23	142.97	(d)	
C-28	31.6	(q)	
C-29	30.21	(q)	
C-30	18.88	(q)	
$O\underline{C}OCH_3$	170.0	169.9	(s)
$OCO\underline{C}H_3$	21.2	21.2	(q)

4.3 Strukturaufklärung von 6-Acetoxytoonaphyllin (11)



(11)

4.3.1 Summenformel und Schmelzpunkt

Die Elementaranalyse[28] ergab 63.26 % C (ber. 65.94) und 7.04 % H (ber. 6.87), die Hochauflösung des M^+-Peaks lieferte die Masse m/e = 528.5982 (ber. 528.6016). Daraus ergibt sich die Summenformel $C_{29}H_{36}O_9$.

Die reine Substanz, kristallisiert aus Methanol, schmilzt bei 157 °C.

4.3.2 Das IR-Spektrum des 6-Acetoxytoonaphyllins

Eine starke, breite IR-Bande bei 3440 cm^{-1} zeigt das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe an. In einer weiteren starken und relativ breiten Bande im Carbonylbereich (1750 cm^{-1}) sind die zwei Absorptionen der Estercarbonylgruppen zu finden. Bei der für α,β -ungesättigte Ketone typischen Frequenz von ca. 1670 cm^{-1} ist keine Bande zu beobachten. Dafür erscheint

eine sehr intensive, breitere Absorption zwischen 1615 und 1655 cm^{-1}, die im IR-Spektrum des Toonaphyllins deutlich in eine Absorption bei 1640 und eine bei 1620 cm^{-1} aufspaltet. Diese Bande enthält die C=O-Valenzschwingungs-Frequenz der Enon-Gruppen, die wegen des Sauerstoffs am β-Kohlenstoffatom bei etwas niedrigerer Wellenzahl[36] erscheint und zu geringerer Frequenz hin schließt sich die ebenfalls intensitätsstarke C=C-Absorptionsbande der C=C-O-Gruppe an[37].

4.3.3 Diskussion der ^{13}C-NMR-Spektren von 6-Acetoxytoonaphyllin

Das breitband-entkoppelte ^{13}C-NMR-Spektrum (Abb. 20) von 6-Acetoxytoonaphyllin weist alle 29 Signale auf, die nach der durch Massefeinbestimmung mittels MS gefundenen Summenformel erwartet werden.

Im Bereich von etwa 200 bis 100 ppm, der charakteristisch ist für an Sauerstoff gebundene oder doppelt gebundene Kohlenstoffe, liegen neun Signale. Ein Blick in das ^{1}H-Spektrum läßt sofort das Vorhandensein je einer Acetyl- und einer Methylestergruppe und die nach chemischer Verschiebung und Multiplizität typischen Furanresonanzen erkennen. Die entsprechenden ^{13}C-Resonanzen werden folgendermaßen zugeordnet: den Signalen 170.77 und 170.49 ppm entsprechen die Gruppen -COOMe bzw. -OAc, denen von 143.27, 139.46, 122.32 und 110.47 ppm die Furankohlenstoffe C-23, C-21, C-20 und C-22. Diese Zuordnung wird sowohl durch Off-Resonance- und NORD-Spektrum, als auch durch zahlreiche Literaturdaten von Di- und Triterpenen unterstrichen[39].

Von den verbleibenden drei Signalen weisen das bei 185.69 und das bei 202.87 ppm chemische Verschiebungen auf, wie sie für α,β-ungesättigte Ketone bzw. Carboxyl-C charakteristisch sind. Das Noise-Off-Resonance-entkoppelte Spektrum weist auch beide als vollständig substituierte Kohlenstoffe aus. Im Protonen-

spektrum fehlen allerdings die zwei Signalgruppen der Enon-Wasserstoffe, die bei etwa 6 und 7 ppm zu erwarten wären. Dafür ist ein scharfes Singulett bei 5.3 ppm zu sehen. Für ein Carboxylproton gibt es keinen Hinweis, auch nicht nach D_2O-Austausch.

Bei Festhalten an einer Enon-Funktion - gesättigte Sechsring-Ketone zeigen typische Resonanzen unter 210 ppm - müssen beide noch verbleibenden Signale im betrachteten Bereich dem α- und β-C-Atom zugehören. Die Hinweise aus den Protonenspektren und der Umstand, daß dann eine starke Tieffeld-Verschiebung vorläge, denn die ^{13}C-Verschiebungen setzen sich in guter Näherung additiv aus den verschiedenen Gerüsteinflüssen und Substituenteninkrementen zusammen, deuten darauf hin, daß eines der C-Atome durch Sauerstoff substitutiert ist.

Eine weiter eng begrenzte Signalgruppe von vier C-Atomen, die $\geq$C-O- und $>$CH-O-Strukturen vorhersagen lassen, befindet sich zwischen ca. 80 und 73 ppm, je zwei der Resonanzen sind im Off-Resonance-Spektrum Singuletts bzw. Dubletts. Da im ^1H-Spektrum das nach chemischer Verschiebung und Signalform typische breite Singulett des 15-H eine 14,15-Epoxidstruktur vermuten läßt und ein Hydroxylproton ohne Kopplungspartner die Struktur einer tertiären OH-Gruppe ausweist, sind die zugehörigen ^{13}C-Signale unter anderem hier zu finden.

Die Resonanzen im Bereich 60 bis 40 ppm und ca. 30 bis 20 ppm (Methylbereich) wurden unter Berücksichtigung ihrer Multiplizitäten und chemischen Verschiebungen zugeordnet. Die Zuordnungen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt, sie wurden durch ein nachfolgendes ^{13}C-^1H-korreliertes Spektrum gesichert.

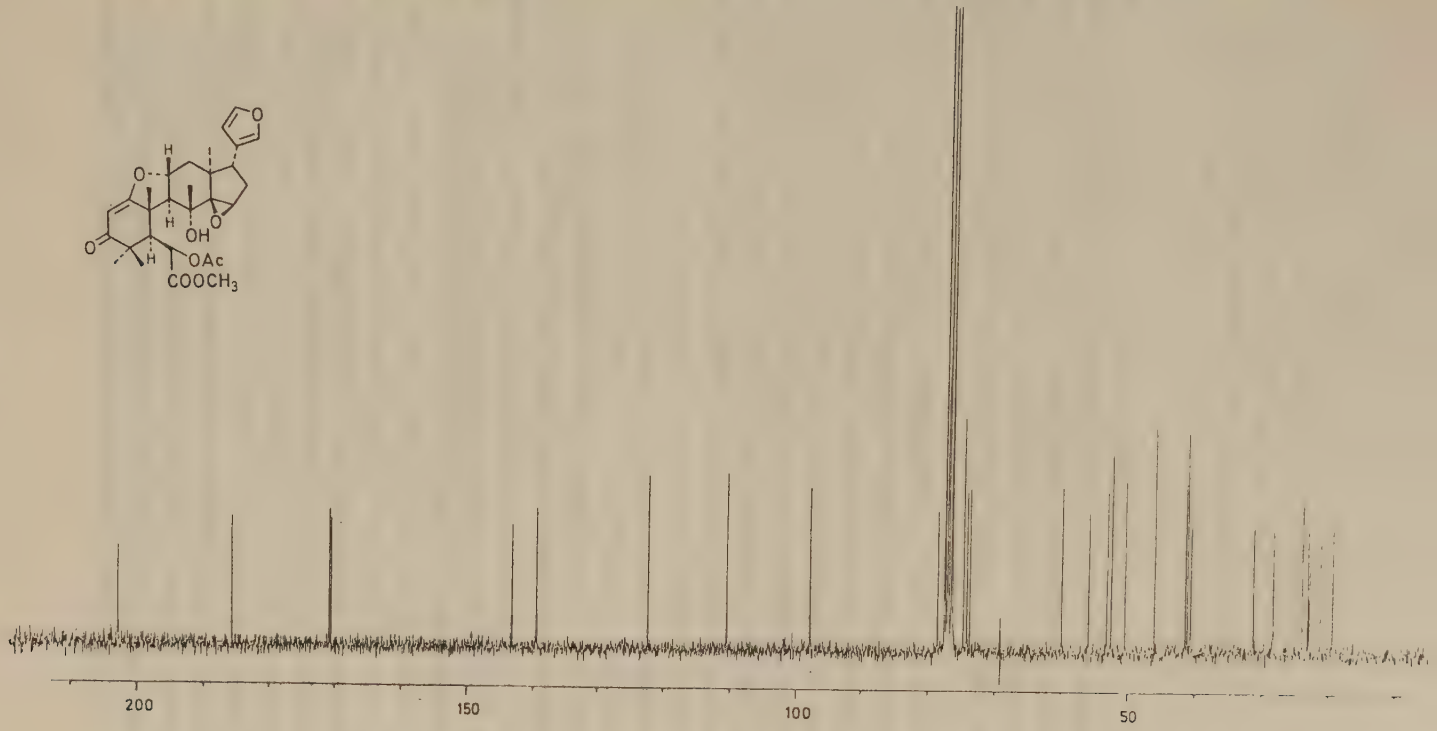


Abb. 20: BB ^{13}C-NMR-Spektrum von 6-Acetoxytoonaphyllin (11)

Tabelle 5: ^{13}C-NMR-Zuordnungen von
6 -Acetoxytoonaphyllin (11)
(δ-Werte in ppm)

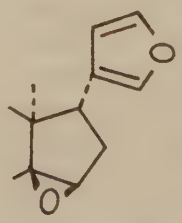
C-1	185.69	(s)
C-2	97.80	(d)
C-3	202.87	(s)
C-4	46.03	(s)
C-5	53.17	(d)
C-6	74.21	(d)
C-7	170.77	(s)
C-8	74.67	(s)
C-9	59.90	(d)
C-10	50.42	(s)
C-11	78.60	(d)
C-12	40.65	(t)
C-13	41.15	(s)
C-14	73.74	(s)
C-15	55.86	(d)
C-16	31.33	(t)
C-17	41.41	(d)
C-18	23.15	(q)
C-19	19.39	(q)
C-20	122.32	(s)
C-21	139.46	(d)
C-22	110.47	(d)
C-23	143.27	(d)
C-28	22.88	(q)
C-29	23.96	(q)
C-30	28.36	(q)
$-OCH_3$	42.49	(q)
-OAc	170.49	(s)
-OAc (Methyl)	21.23	(q)

4.3.4 Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 6-Acetoxytoonaphyllin

Dem 250 MHz-^{1}H-Spektrum (Abb. 21) kann sofort das Vorliegen von fünf Methylgruppen, zwei davon bei auffallend tiefem Feld, einer Acetyl- und einer Methylestergruppe entnommen werden. Von den vier Signalgruppen zwischen 7.5 und 6.2 ppm sind drei rasch zu identifizieren. Sie charkaterisieren aufgrund ihrer chemischen Verschiebung und ihrer feinen Aufspaltung durch Long-Range-Kopplungen einen β-substituierten Furanring, wie er bei zahlreichen Triterpenoiden anzutreffen ist (δ = 7.40 ppm ≙ 23-H, 7.17 ppm ≙ 21-H, 6.21 ppm ≙ 22-H). Da man von einem Triterpenoid ausgehen kann, bei dem laut Summenformel neun Sauerstoffatome unterzubringen sind, soll weiter überlegt werden, welche Positionen und Teilstrukturen dafür in Frage kommen.

Der D_2O-Austausch weist auf ein acides Proton ohne Kopplungspartner hin, folglich muß eine Hydroxylgruppe an einem vollständig substituierten Kohlenstoff vorhanden sein. Das Vorliegen einer Lactonstruktur ist nicht zu vermuten, denn die beiden dafür in Frage kommenden Signale im ^{13}C-Spektrum sind bereits den Gruppen -OAc und -COOMe zugeordnet. Dafür gibt es aber den Hinweis auf ein α,β-ungesättigtes Keton, das sauerstoff-substituiert sein könnte.

Das neunte und letzte O-Atom könnte in Form eines Epoxidringes an C-14 und C-15 untergebracht werden. Das legt das breite Singulett bei 3.55 ppm nahe. Damit würde gleichzeitig die Teilstruktur



des D-Ringes sehr wahrscheinlich gemacht.

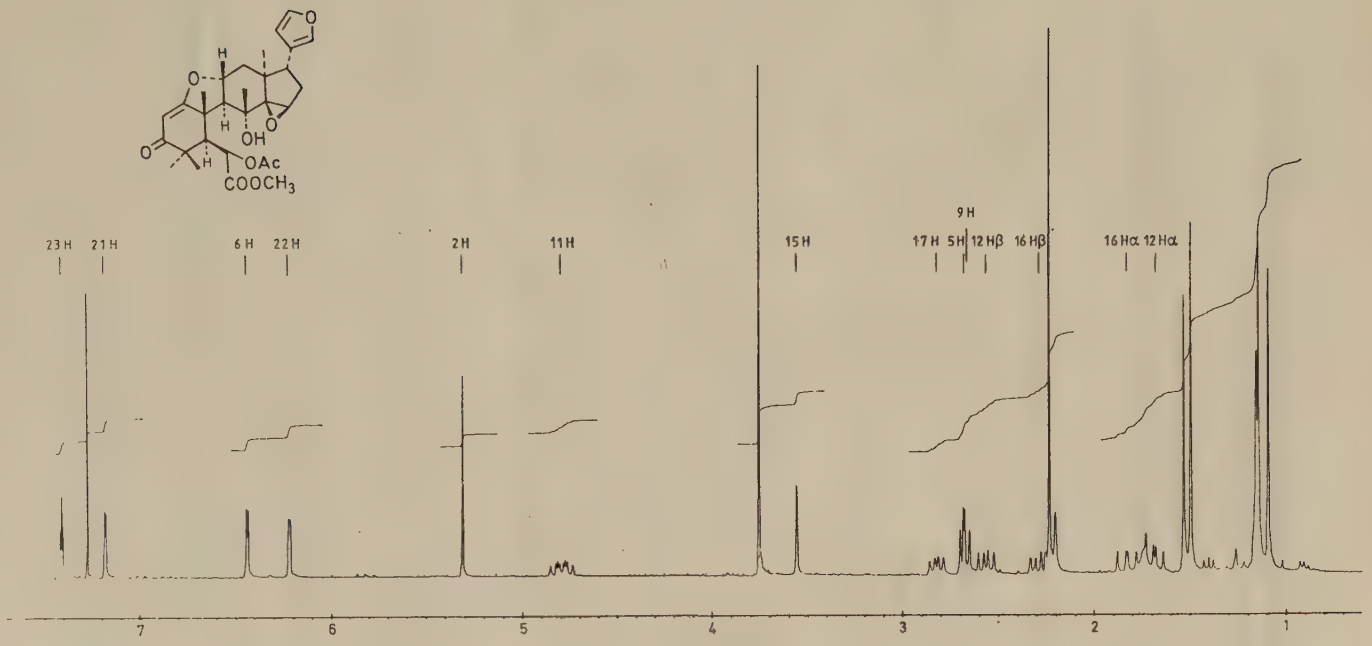


Abb. 21: 250 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum des 6-Acetoxytoonaphyllins (11)

4.3.5 Homodecoupling-Experimente am ^{1}H-Spektrum und Zuordnung der Gerüstprotonen

Um die miteinander koppelnden Protonen eindeutig indentifizieren zu können, wurden folgende Doppelresonanzexperimente durchgeführt:

Einstrahlpunkt	Kopplungspartner
6.43 ppm	2.67 ppm
4.77 ppm	2.66 ppm, 2.55 ppm, 1.68 ppm
2.81 ppm	1.28 ppm, 1.82 ppm
2.66 ppm	6.43 ppm, 4.77 ppm

Bei Einstrahlen auf das Dublett bei 6.43 ppm tritt bei 2.67 ppm ein scharfes Singulett auf, Einstrahlen bei 2.67 bzw. 2.66 ppm bewirkt außer der Entkopplung des Signals bei 6.43 ppm eine Vereinfachung des Multipletts bei 4.77 ppm zum dd. Bei dem Dublett bei 6.43 ppm handelt es sich um 6-H, das infolge seiner Nachbarschaft zur Acetylgruppe und seiner Nähe zur COOMe-Gruppe eine starke Tieffeld-Verschiebung erfährt. Es koppelt mit 5-H (2.67 ppm), die Kopplungskonstante beträgt $^3J_{6\text{-H}/5\text{-H}} = 1.8$ Hz.

Das Multiplett bei 4.77 ppm entspricht 11-H, die paramagnetische Verschiebung wird bewirkt durch den 1,11-Ethersauerstoff. Die große vicinale Kopplungskonstante des Vierspinsystems $^3J = 11.9$ Hz deutet auf angenähert diaxiale Orientierung zum Kopplungspartner 9-H bei 2.66 ppm hin. Die beiden anderen vicinalen Kopplungen zu den Protonen an C-12 haben die Werte $^3J_{11/12\alpha} = 9.8$ Hz (chemische Verschiebung 12-Hα = 1.68 ppm) und $^3J_{11/12\beta} = 7.3$ Hz (chemische Verschiebung 12-Hβ = 2.55 ppm), die geminale Kopplungskonstante $^2J_{12\text{-H}\alpha/\beta}$ beträgt 12.8 Hz (Abb. 22).

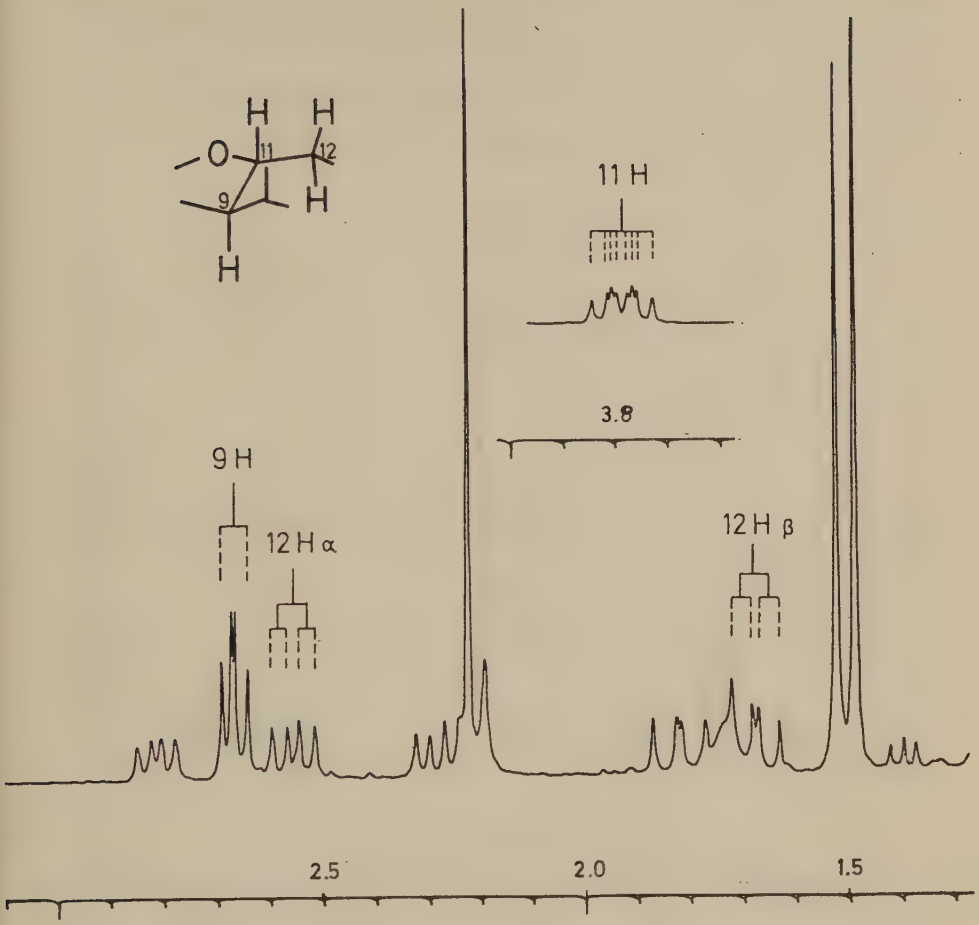


Abb. 22: Vierspinsystem 11-H, 9-H, 12-Hβ und 12-Hα

Als nächstes sollen die Protonen 17-H, 16-Hα und 16-Hβ als AMX-Dreispinsystem (Abb. 23) behandelt werden, dabei bleibt die kleine Kopplung zu 15-H (δ = 3.55 ppm), die weniger als 1 Hz beträgt und sich durch ein verbreitertes Signal bemerkbar macht, unberücksichtigt. Durch Einstrahlen bei 2.18 ppm (17-H)

brechen die zwei vicinalen Kopplungen der Doppeldubletts zusammen und gehen in jeweils ein Dublett (δ = 2.25 ppm ≙ 16-Hβ, δ = 1.82 ppm ≙ 16-Hα) mit der gemeinsamen geminalen Kopplung von $^{2}J_{16/16}$ = 13.6 Hz über. Die vicinalen Kopplungen $^{3}J_{17/16\alpha}$ wurden zu 11.1 Hz bzw. $^{3}J_{17/16\beta}$ zu 6.5 Hz bestimmt.

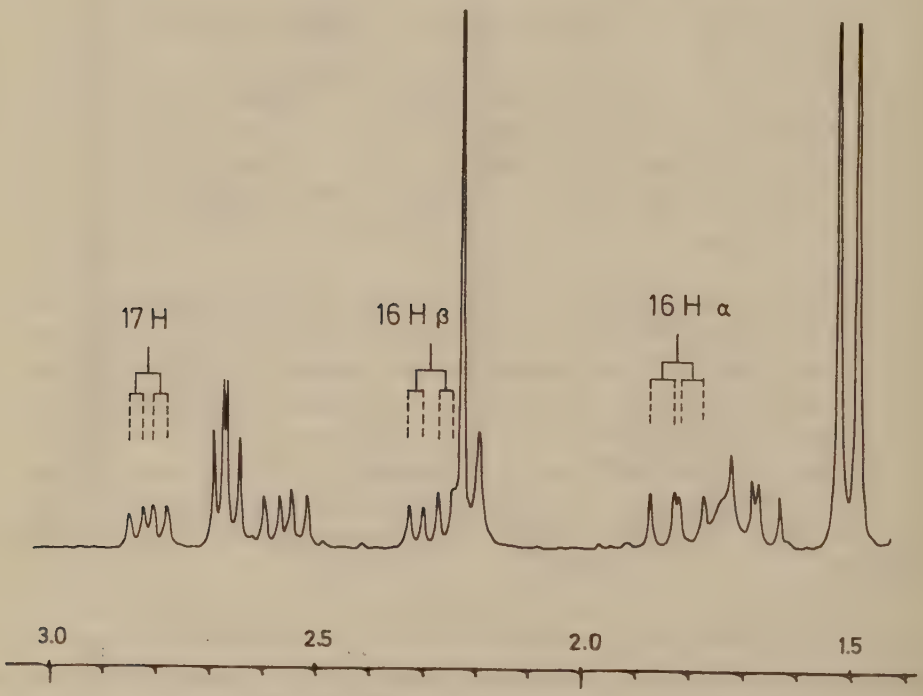


Abb. 23: 17-H, 16-Hβ und 16-Hα als Dreispinsystem

Die Analysen aller bis hierher behandelten Spinsysteme wurden durch Computersimulation überprüft und die berechneten Spektren den experimentellen gegenübergestellt (Abb. 24). Zum Schluß soll noch auf die Resonanzen des Hydroxyl-H eingegangen werden. Die konzentrationsabhängige chemische Verschiebung für das

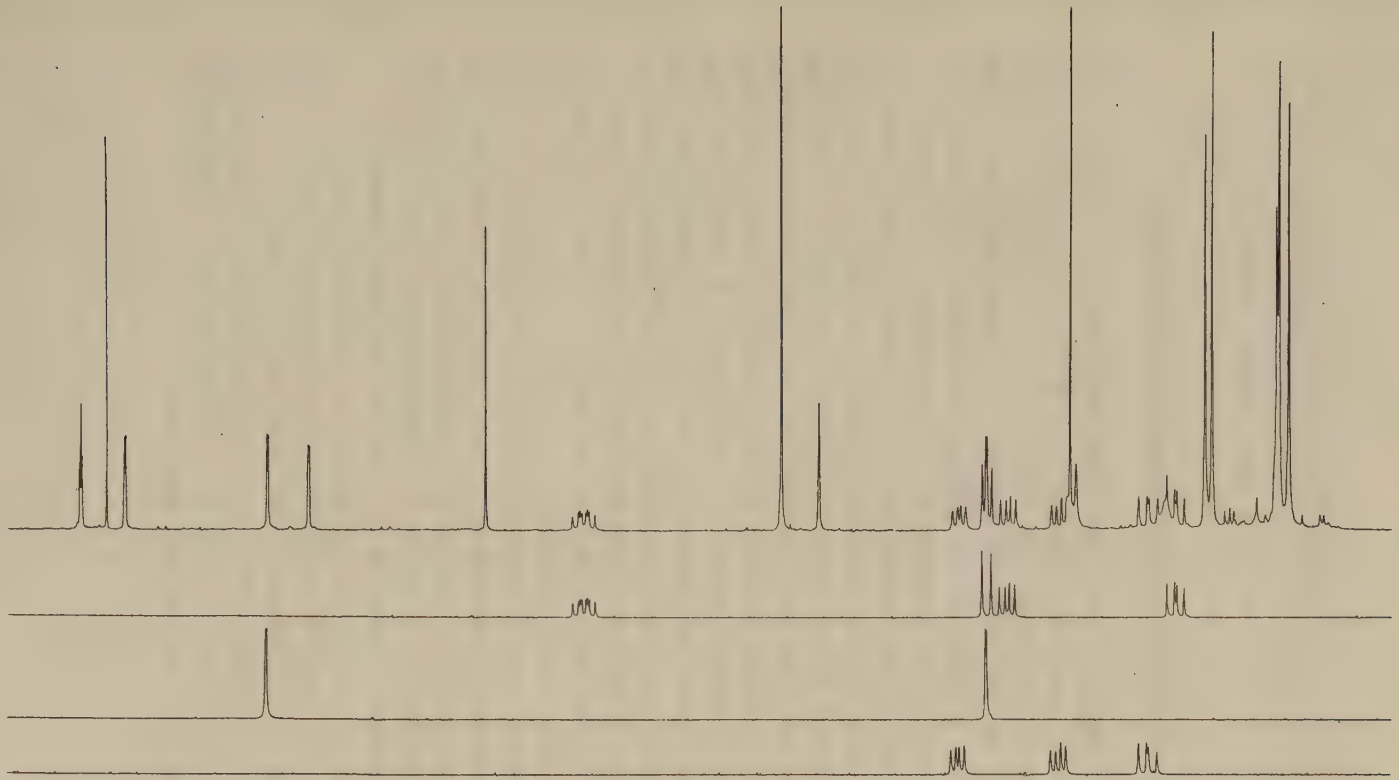


Abb. 24: erste (obere) Spur: experimentelles Spektrum (11)
zweite Spur: Simulation 4-Spinsystem 11-H, 9-H, 12-Hβ, 12-Hα
dritte Spur: Simulation 6-H, 5-H
untere Spur: Simulation 3-Spinsystem 17-H, 16-Hβ , 16-Hα

OH-Proton beträgt hier 2.19 ppm, das Signal zeigt keine Aufspaltung und wird damit dem vollständig substituierten C-8 zugeteilt.

4.3.6 Die chemische Verschiebung der Methylgruppen

Die Methylgruppen konnten durch NOE-Messungen vollständig und eindeutig zugeordnet werden, die δ-Werte (in ppm) betragen für 19-H 1.52, für 29-H 1.49, für 28-H 1.15, für 30-H 1.14 und für 18-H 1.09. Die Begründungen für die getroffenen Zuordnungen sind bei der Diskussion der NOE-Spektren genauer erläutert. Hier soll auf die Konsequenzen aus der starken Tieffeld-Verschiebung der beiden Methylgruppen 19-H und 29-H eingegangen werden. Die tiefe Lage beweist zunächst, daß der wohl ursprünglich vorhandene B-Ring an C-5 equatorial verknüpft gewesen sein mußte. Nur bei α-axialer Stellung von 5-H ist die beobachtete starke Methyl-Wechselwirkung mit der 6-Acetoxy-Gruppe oder der 7-Methylester-Gruppe überhaupt realisierbar. Die Entscheidung, welche der beiden Oxo-Gruppen für den Shift verantwortlich ist, hängt davon ab, ob der Substituent an C-6 bei geschlossenem Ring α- oder β-Position einnimmt. Zwei entscheidende Gründe sprechen für den Acetoxy-Substituenten als für den Tieffeld-Shift verantwortliche Gruppe:

1) Mit Ausnahme von 6β-Acetoxyobacunol[40] weisen sämtliche bisher bekannten Limonoide bei Substitution an C-6 α-Konfiguration auf. Leichte Drehung nach Ringöffnung um die 5/6-Bindung bringt 6-H in die in den NOE-Spektren bewiesene Dipol-Dipol-Wechselwirkung zu 30-H und den 6α-Substituenten in Wechselwirkung zu den Methylgruppen 29-H und 19-H.
2) Bei der in den NOE-Spektren für 6-H gegebenen Anordnung ist nur die $OCOCH_3$-Gruppe in der Lage, auf 19-H und 29-H gleichzeitig stark entschirmenden Einfluß auszuüben. Durch die COOMe-Gruppe würde 29-H erheblich stärker betroffen, das widerspräche dem Protonen-Spektrum.

Tabelle 6: Zuordnung der Protonenresonanzen des 6-Acetoxytoonaphyllins (11)
(δ-Werte in ppm, J-Werte in Hz)

2-H	5.30	s					
5-H	2.67	d	$^3J_{5/6}$	= 1.8			
6-H	6.43	d	$^3J_{6/5}$	= 1.8			
9-H	2.66	d	$^3J_{9/11}$	= 11.9			
11-H	4.77	m	$^3J_{11/9}$	= 11.9	$^3J_{11/12\alpha}$	=	9.8
			$^3J_{11/12\beta}$	= 7.3			
12-Hα	1.68	dd	^2J	= 12.8	$^3J_{12\alpha/11}$	=	9.8
12-Hβ	2.55	dd	^2J	= 12.8	$^3J_{12\beta/11}$	=	7.3
15-H	3.55	b.s					
16-Hα	1.82	dd	^2J	= 13.6	$^3J_{16\alpha/17}$	=	11.1
16-Hβ	2.28	dd	^2J	= 13.6	$^3J_{16\beta/17}$	=	6.5
17-H	2.81	dd	$^3J_{17/16\alpha}$	= 11.1	$^3J_{17/16\beta}$	=	6.5
18-H	1.09	s					
19-H	1.52	s					
28-H	1.15	s					
29-H	1.49	s					
30-H	1.14	s					
21-H	7.17	m					
22-H	6.21	m					
23-H	7.40	m					
$-COOCH_3$	3.75	s					
$-OCOCH_3$	2.27	s					

4.3.7 NOE-Experimente an 6-Acetoxytoonaphyllin

Beim Betrachten der NOE-Messungen fällt auf, daß einige Spektren in sich widersprüchlich erscheinen, das heißt, daß Signale von Protonen erscheinen, die sicher nicht in einer Ebene liegen können. Der Grund hierfür besteht darin, daß insbesondere die Methylgruppen bei 1.14 und 1.15 ppm so nahe beieinanderliegen, daß sich beim Einstrahlen auf die eine eine teilweise Sättigung der danebenliegenden nicht verhindern läßt. Bei der Beurteilung der Spektren müssen demzufolge die Intensitäten der Signale eine entscheidende Beachtung finden (Abb. 25).

Beim Einstrahlen auf die Methylgruppe bei 1.09 ppm erfahren die Furanprotonen 21-H und 22-H einen positiven NOE-Effekt, ebenso 9-H, das Proton der Hydroxylgruppe an C-8 und die α-Protonen an C-16 und C-12. Diese Signale sind zu erwarten bei α-Stellung der 18-Methylgruppe und des Furanringes.

Strahlt man auf die Methylgruppen bei 1.14 bzw. 1.15 ppm ein, erhält man im wesentlichen die gleiche Signalfolge, allerdings mit jeweils umgekehrten Intensitätesverhältnissen. Sinnvoll zu interpretieren sind diese Spektren nur, wenn die Methylgruppe bei 1.14 ppm 28-H zugeordnet wird. Zu sehen ist dann 29-H und 5-H, das α-Stellung einnimmt.

Die restlichen Signale von 6-H, 11-H, 15-H und dem Hydroxyl-H erhalten eine starke Intensitätszunahme bei Sättigung der Frequenz bei 1.15 ppm, ferner verstärkt sich das Methylsignal bei geringster Feldstärke. Bei letzterer Methylgruppe, δ= 1.53 ppm, muß es sich um 19-H handeln, die eingestrahlte Frequenz entspricht der von 30-H, die Stellung ist wie erwartet β. Aus diesem Experiment wird gleichzeitig deutlich, daß die 1,11-Etherbrücke bezüglich des C-Ringes equatoriale Verknüpfung zeigt, 11-H also α-ständig ist.

Abb. 25: NOE-Spektren des Acetoxytoonaphyllins (11)

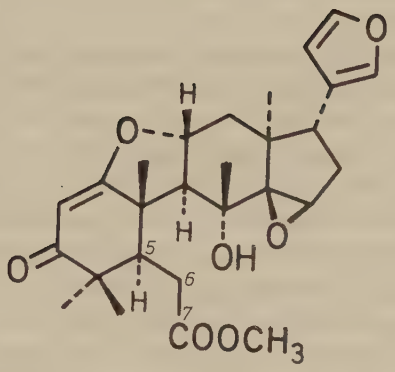
Dieses Ergebnis wird bestätigt bei Einstrahlen auf 19-H (1.53 ppm). 11-H erfährt hierdurch einen besonders starken Nuclear-Overhauser-Effekt, ferner sind 6-H und 30-H zu beobachten. 29-H, dessen Signal eigentlich auch erwartet wird, wird wegen seiner geringen Entfernung von nur 0.04 ppm vom Einstrahlpunkt ebenfalls erfaßt.

4.4 Strukturaufklärung von Toonaphyllin (12) und 6-Hydroxytoonaphyllin (13)

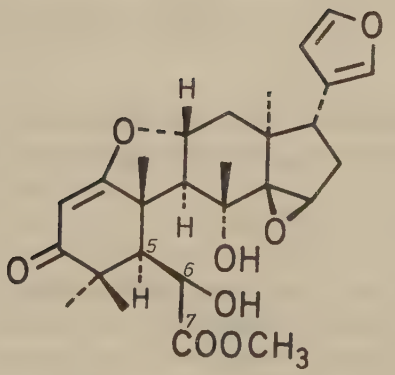
4.4.1 Summenformel und Schmelzpunkte von Toonaphyllin (12) und 6-Hydroxytoonaphyllin (13)

Die Massefeinbestimmung durch Hochauflösung des M^+-Peaks lieferte für Toonaphyllin (12) m/e = 470.2308 (ber. 470.5648) und für 6-Hydroxytoonaphyllin (13) m/e = 486.2252 (ber. 486.5642).

Daraus ergab sich die Summenformel $C_{27}H_{34}O_7$ bzw. $C_{27}H_{34}O_8$. Die Schmelzpunkte der aus Methanol kristallisierten Substanzen betragen für (12) 141 °C und für (13) 146 °C.



(12)



(13)

4.4.2 Die IR-Spektren von Toonaphyllin und 6-Hydroxytoonaphyllin

Am auffallendsten unterscheiden sich die beiden IR-Spektren im übersichtlichen Bereich zwischen 3200 und 3600 cm^{-1}. Während das Toonaphyllin-Spektrum eine intensive, breite und zum Maximum bei 3440 cm^{-1} symmetrische Bande der OH-Valenzschwingung besitzt, ist im IR-Spektrum des 6-Hydroxytoonaphyllins dieser eine starke Aufspaltung bei 3590 cm^{-1} vorgelagert, die von nicht assoziiertem OH oder von intramolekularer Wasserstoffbrückenbildung hervorgerufen sein könnte. Zu tieferer Frequenz hin zeigt die 6-Hydroxy-Verbindung zusätzlich eine Schulter, die die OH-Bande breiter werden läßt als beim Toonaphyllin. Beiden gemeinsam sind erwartungsgemäß die intensiven und relativ breiten Absorptionen der C-O-Valenzschwingungen zwischen 1210 und 1140 cm^{-1} und die Estercarbonylbande bei 1750 cm^{-1}. Die Absorptionsfrequenz des α,β -ungesättigten Ketons ist wie beim 6-Acetoxytoonaphyllin zu größerer Wellenlänge hin verschoben. Das Vorhandensein des β-substituierten Furanringes macht sich durch die charakteristische Bande bei 870 cm^{-1} bemerkbar.

4.4.3 Interpretation des ^{1}H-NMR-Spektrums von Toonaphyllin und Homodecoupling-Experimente (Abb. 26, Tab. 7)

Die drei Signale zwischen ca. 7.4 und 6.2 ppm beweisen das Vorhandensein eines β-substituierten Furanringes, das scharfe Signal bei 5.30 ppm ohne Kopplungspartner gehört zu dem Enon-Proton an C-2. Die Methylgruppe der Esterfunktion an C-7 erscheint als Singulett bei 3.70 ppm und das verbreiterte Signal bei 3.56 ppm für 15-H impliziert das β-ständige 14,15-Epoxid.

Die Zuordnung der Resonanzen im Bereich von 2.9 bis 1.6 ppm gelingt mit Hilfe von Doppelresonanz-Experimenten. Durch Einstrahlen bei 2.81 ppm vereinfachen sich die Multipletts bei

2.28 und 1.82 ppm zu Dubletts mit der gemeinsamen großen Kopplungskonstanten von 13.6 Hz. Sie sind damit als geminale Protonen ausgewiesen und ihre Zugehörigkeit zu einem Drei-Spin-System (Abb. 27) charakterisiert sie als 16-Hβ und 16-Hα und grenzt sie ab zur CH_2-Gruppe an C-12, deren Resonanzen

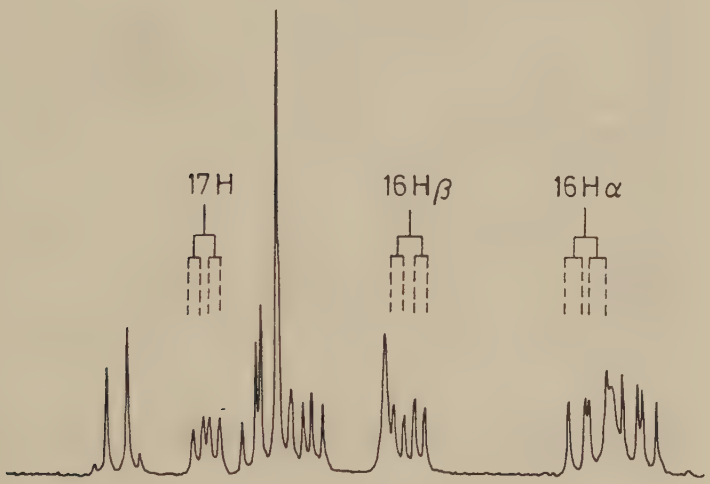


Abb. 27: 17-H, 16-Hβ und 16-Hα des Toonaphyllins (12) als Drei-Spin-System

in Aussehen und Lage ähnlich sind. Letztere sind Bestandteile eines Vier-Spin-Systems (Abb. 28), bestehend aus 9-H, 11-H und 12-Hα und β. Die Multiplizität des Signals bei 4.76 ppm (ddd) legt nahe, daß man durch Entkoppeln dieses Multipletts sofort alle Partner des Spinsystems auffinden kann. Strahlt man darauf ein, erhält man bei 2.65 ppm ein scharfes Singulett, aus den zwei doppelten Dubletts bei 2.55 und 1.68 ppm entstehen je ein

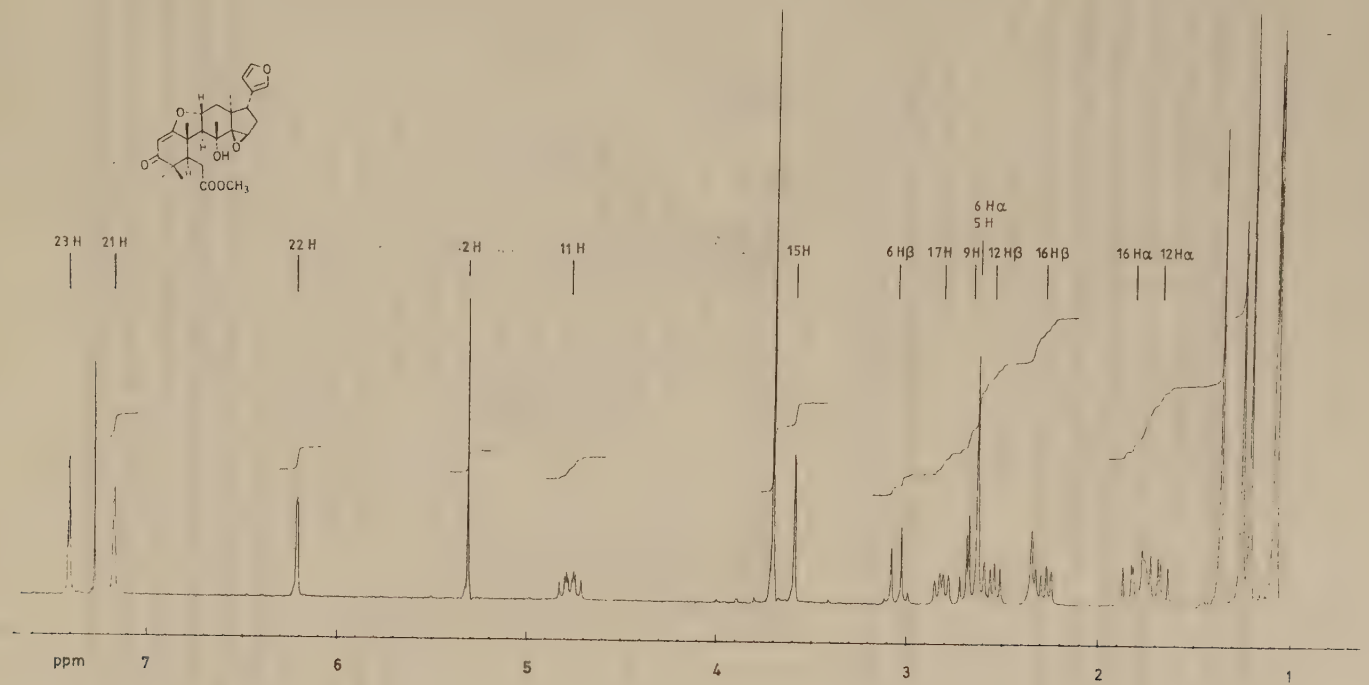


Abb. 26: 250 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum des Toonaphyllins (12)

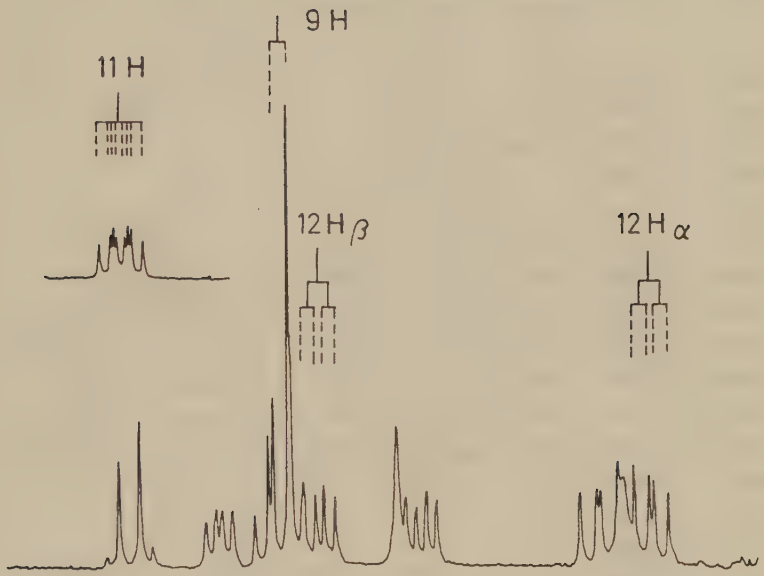


Abb. 28: Vier-Spin-System 11-H, 9-H, 12-Hβ und 12-Hα.

einfaches Dublett. Damit sind diese beiden Signale als 12-Hα/β erkannt, der Betrag ihrer geminalen Kopplungskonstanten ist 12.8 Hz. Die weitere Unterscheidung nach α- und β-Stellung ist, wie auch bei den Protonen an C-16, aufgrund der Aussagen aus den NOE-Spektren möglich. Danach kommt den jeweils bei höherem Feld liegenden Multipletts die α-Position zu. Das zum Singulett bei 2.65 ppm entkoppelte Dublett ist das 9-H-Signal, seine Kopplungskonstante zu 11-H unterstreicht die angenähert bisaxiale trans-Stellung der beiden Protonen zueinander. Um die chemischen Verschiebungen für dieses Vier-Spin-System genau festzulegen und die Kopplungskonstanten exakt zu bestimmen, wurde dieser Teil des Spektrums Computer-simuliert (Abb. 29).

Tabelle 7: ^{1}H-NMR-Daten von Tooanphyllin (12)
(δ-Werte in ppm, J-Werte in Hz)

2-H	5.30	s				
5-H	2.65*	ABM-System				
6-Hα	2.67*					
6-Hβ	3.04*					
9-H	2.65	d	$^3J_{9/11}$ = 11.8			
11-H	4.76	m	$^3J_{11/9}$ = 11.8			
12-Hα	1.68	dd	^2J = 12.8	$^3J_{12\alpha/11}$ = 9.7		
12-Hβ	2.55	dd	^2J = 12.8	$^3J_{12\beta/11}$ = 7.5		
15-H	3.56	b.s				
16-Hα	1.82	dd**	^2J = 13.6	$^3J_{16\alpha/17}$ = 11.1		
16-Hβ	2.28	dd**	^2J = 13.6	$^3J_{16\beta/17}$ = 6.5		
17-H	2.81	dd	$^3J_{17/16\alpha}$ = 11.1	$^3J_{17/16\beta}$ = 6.5		
21-H	7.16	m				
22-H	6.20	m				
23-H	7.40	m				
18-H	1.08	s				
19-H	1.36	s				
28-H	1.09	s				
29-H	1.21	s				
30-H	1.25	s				
$COOCH_3$	3.70	s				
OH	2.35	s				

* ABM-System, Werte abgeschätzt

** kleine Kopplung zu 15-H unberücksichtigt

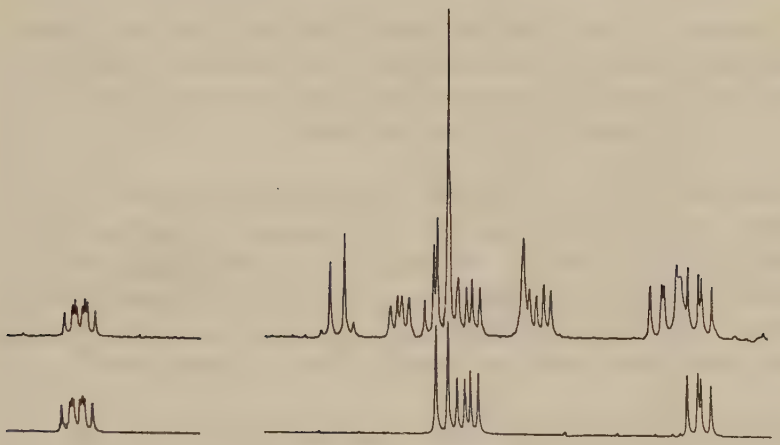


Abb. 29: Simulation des Vier-Spin-Systems 11-H, 9-H, 12-Hα und 12-Hβ, obere Spur experimentelles Spektrum

Von den Resonanzen der Gerüstprotonen bleiben noch 5-H und $6\text{-H}_{1/2}$ zu interpretieren. Sie bilden ein ABM-System, von dem nur insgesamt acht Linien zu beobachten sind. Damit ist eine Auswertung nach den Regeln 1. Ordnung nicht mehr möglich. Aus diesem Grund wurde versucht, durch Aufnahme eines 400 MHz-Spektrums[41)] eine gegenüber dem Betrag der Kopplungskonstanten deutlich größere Verschiebungsdifferenz der Kerne zu erreichen. Der Betrag von ν sollte wenigstens um etwa Faktor 5 größer sein als der Betrag von J. Leider brachte dieser Versuch nicht den ausreichenden Effekt. Trotzdem kann eine in gewissen Grenzen richtige Zuordnung unter Zuhilfenahme der NOE-Spektren getroffen werden. Demnach gehört das Multiplett bei 3.05 ± 0.05 ppm zu 6-Hβ und zu 6-Hα das bei 2.65 ± 0.05 ppm.

4.4.3.1 NOE-Messungen am Toonaphyllin

Das Toonaphyllin-Spektrum hat ebenso wie dasjenige des 6-Acetoxytoonaphyllins fünf Methylsignale, die allerdings weniger stark Tieffeld-verschoben sind. Die Zuordnung soll wieder durch NOE-Experimente (Abb.29a) erfolgen.

Bei Einstrahlen auf 18-H sind die beiden Furanprotonen 21-H und 22-H, 9-H sowie 16-H und 12-H zu beobachten. Das dem 9-H unterlegte Signal muß bereits als 5-H und 6-H (Intensitäten) gedeutet werden, die in räumlicher Nähe zu 28-H stehen und beim Einstrahlen auf diese Methylgruppe sehr viel deutlicher hervortreten. Auch 29-H zeigt wie erwartet ein starkes Signal.

Das gleiche 6-H Proton wie oben taucht auch auf, wenn auf 29-H eingestrahlt wird. Im Methylbereich sind 19-H und 28-H gut zu sehen.

Beim Einstrahlen auf die Methylgruppen 30-H und 19-H zeigt sich, daß die Protonen 11-H und 6-H sich in räumlicher Nachbarschaft zu den CH_3-Gruppen befinden, desgleichen liegen erwartungsgemäß die Gruppen 19-H und 30-H bzw. 29-H, 30-H und 19-H in einer Ebene.

Die NOE-Experimente an den strukturell verwandten Substanzen 6-Acetoxytoonaphyllin und Toonaphyllin zeigen Übereinstimmung an den entscheidenden Positionen:
5-H ist α-ständig, die Seitenkette aus dem geöffneten B-Ring liegt also β-equatorial. Die Methylgruppen an C-10 und C-8 stehen α-axial, die an C-13 α-axial bei ebenfalls α-Stellung des Furanringes. Die Protonen 9-H und 11-H nehmen α- bzw. β-axiale Position ein, daraus folgt für die 1,11-Etherbrücke eine equatoriale Lage.

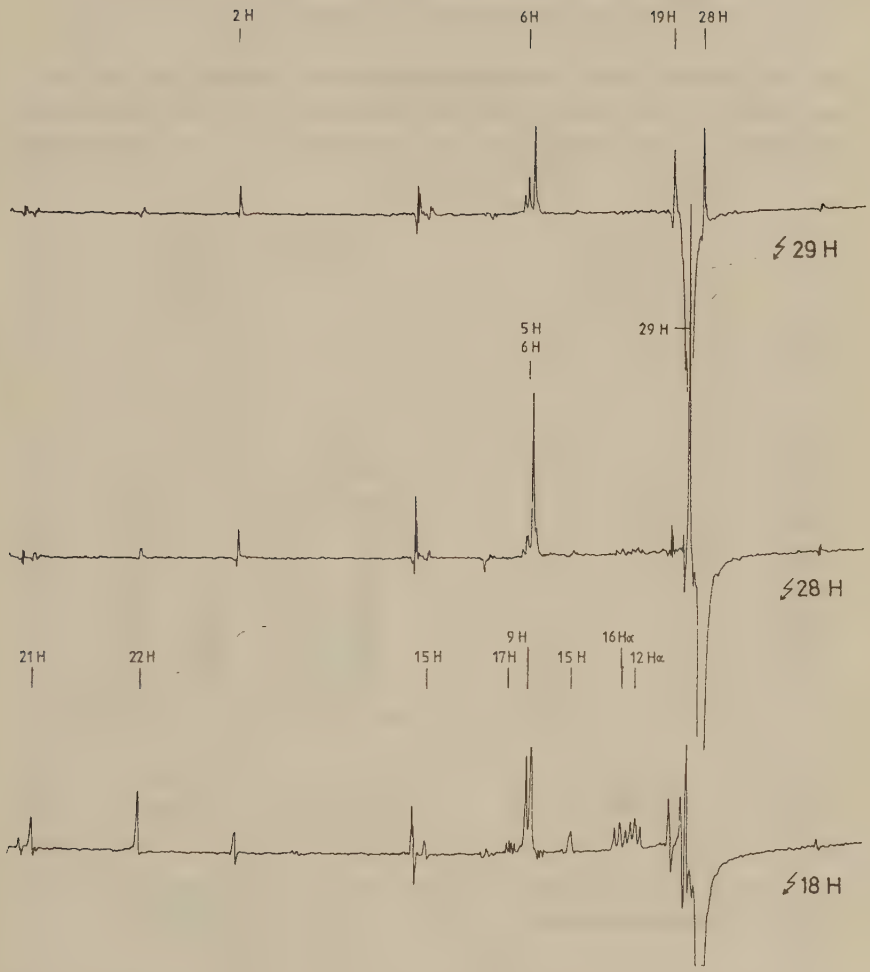


Abb.29a: NOE-Spektren von Toonaphyllin (12)

4.4.4 Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 6-Hydroxytoonaphyllin (Abb. 30)

Die Einführung einer Hydroxylfunktion an C-6 wird am Auftreten eines Dubletts bei 5.49 ppm deutlich, das damit dort noch verbliebene Proton repräsentiert Abbildung 31. Die Verschiebung

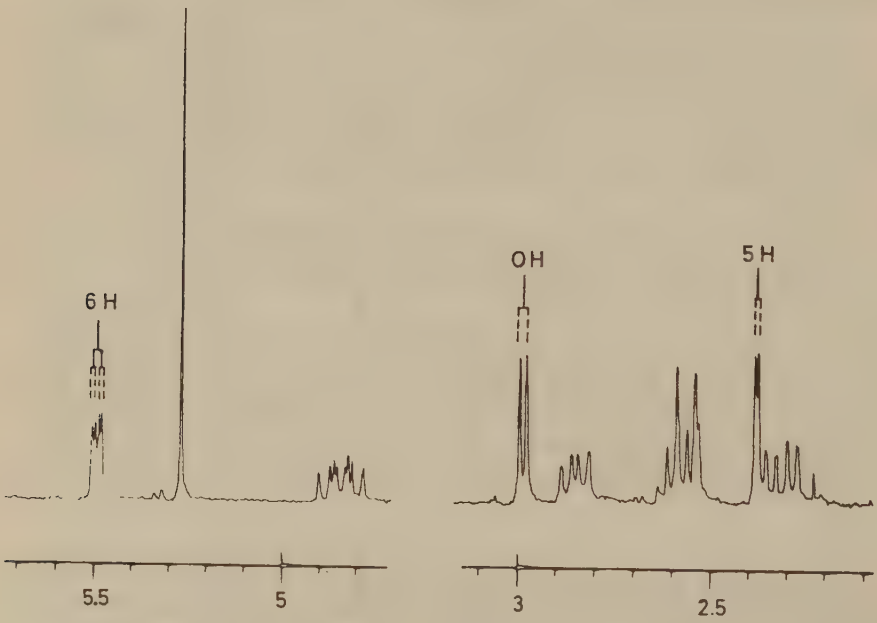


Abb. 31: Drei-Spin-System 6-H, OH und 5-H des 6-Hydroxytoonaphyllins

von 6-H durch die OH-Gruppe zu so tiefem Feld mag drastisch erscheinen, es ist aber dabei auch noch der Einfluß der Methylester-Funktion an C-7 zu berücksichtigen. Es sei darauf hingewiesen, daß schon im unsubstituierten Fall eine der Protonenresonanzen der CH_2-Gruppe unter 3 ppm zu finden ist. Der Beweis

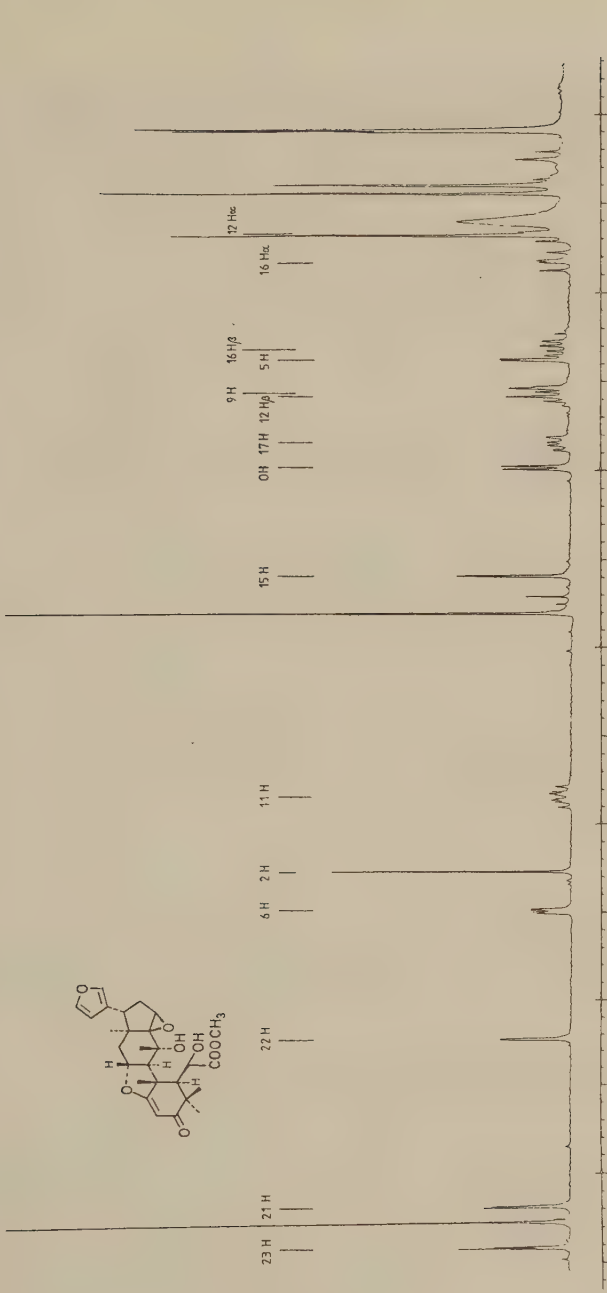


Abb. 30: 250 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum von 6-Hydroxytoonaphyllin (13)

Tabelle 8: ^{1}H-NMR-Daten des 6-Hydroxytoonaphyllins (13)
(δ-Werte in ppm, J-Werte in Hz)

2-H	5.26	s		
5-H	2.37	d	$^3J_{5/6}$ = 2	
6-H	5.49	dd	$J_{6/OH}$ = 3	$^3J_{6/5}$ = 2
9-H	2.56	d	$^3J_{9/11}$ = 11.8	
11-H	4.84	m	$^3J_{11/9}$ = 11.8	
12-Hα	1.67	dd	^2J = 12.8	$^3J_{12\alpha/11}$ = 9.7
12-Hβ	2.57	dd	^2J = 12.8	$^3J_{12\beta/11}$ = 7.5
15-H	3.59	b.s		
16-Hα	1.82	dd*	^2J = 13.6	$^3J_{16\alpha/17}$ = 11.1
16-Hβ	2.31	dd*	^2J = 13.6	$^3J_{16\beta/17}$ = 6.5
17-H	2.85	dd	$^3J_{17/16\alpha}$ = 11.1	$^3J_{17/16\beta}$ = 6.5
18-H	1.08	s		
19-H	1.44	s		
28-H	1.09	s		
29-H	1.68	s		
30-H	1.40	s		
21-H	7.18	m		
22-H	6.22	m		
23-H	7.41	m		
$COOCH_3$	3.8	s		
OH (6)	2.98	d		
OH (8)	1.79	s		

* kleine Kopplung zu 15-H unberücksichtigt

für die Kopplung des Doppeldubletts mit einer Hydroxylgruppe läßt sich mit Hilfe von D_2O-Zusatz erbringen. Dadurch verschwindet das Dublett bei 2.98 ppm infolge raschen Austauschs und bei dem betrachteten Signal bricht die größere der beiden Kopplungen zusammen. Übrig bleibt noch die kleine Kopplung von 2 Hz zu 5-H (Dublett bei 2.37 ppm). Die Positionen der restlichen Gerüstwasserstoffe bleiben gegenüber dem zuvor behandelten Spektrum erwartungsgemäß nahezu unverändert. Die Zuordnung kann deshalb analog erfolgen (Tab. 8).

4.4.5 Vergleich der chemischen Verschiebungen der angulären Methylgruppen

Bei 6-Axetoxytoonaphyllin wurde die starke Verschiebung der Methlgruppen an C-4 und C-10 zu tieferem Feld auf den Einfluß der 6-Acetoxygruppe zurückgeführt. Vergleicht man die Lage der CH_3-Gruppen im strukturell verwandten Toonaphyllin damit, so registriert man hier wie vermutet ein Ansteigen zu höherem Feld. Erwartungsgemäß ist 28-H mit einer Verschiebungsdifferenz von nur 0.06 ppm wenig betroffen, am deutlichsten ist der Effekt bei 29-H (Differenz: 0.37 ppm), während 19-H, noch beeinflußt durch die 1,11-Etherbrücke, jetzt bei 1.36 ppm erscheint (Differenz: 0.16 ppm).

Übersicht über die chemischen Verschiebungen der angulären Methylgruppen von 6-Acetoxytoonaphyllin (11), 6-Hydoxytoonaphyllin (13) und Toonaphyllin (12):

	28-H	29-H	19-H	30-H	18-H
(11)	1.15	1.49	1.52	1.14	1.09
(13)	1.09	1.68	1.44	1.40	1.08
(12)	1.09	1.12	1.25	1.36	1.08

Wird die 6-Acetoxygruppe durch die kleinere Hydroxylfunktion ersetzt, wandert 29-H besonders stark (Differenz: 0.56 ppm) zu tieferem Feld. Diese Beobachtung deckt sich mit Erfahrungen, die am Beispiel von 11-β-substituierten Terpenoiden[42] gemacht wurden. Auch hier wird die besonders stark shiftende Wirkung des OH-Substituenten auf die nächstbenachbarte Methylgruppe und die geringere Beeinflussung etwas weiter entfernter deutlich.

4.4.6 Die ^{13}C-NMR-Spektren von Toonaphyllin und 6-Hydroxytoonaphyllin

Die ^{13}C-NMR-Spektren von Toonaphyllin (Abb. 32) und von Hydroxytoonaphyllin (Abb. 33) stimmen weitgehend mit dem von 6-Acetoxytoonaphyllin überein. Die Zuordnung für die nicht durch Änderungen infolge von Substituenten betroffenen Kohlenstoffe werden deshalb durch Vergleich mit den Werten aus dem 6-Acetoxytoonaphyllin-Spektrum getroffen und in Tabelle 9 aufgelistet. Die Spektrendiskussion soll lediglich für die abweichenden Signale der C-Atome 4 bis 6 erfolgen.

4.4.7 Auswirkungen der Substitution an C-6 auf die chemische Verschiebung der α-, β- und γ-C-Atome

Substitution eines Protons durch die Hydroxylgruppe an C-6 führt zu einer Tieffeldverschiebung des Signals des α-Kohlenstoffs um 48 ppm und des β-Kohlenstoffs um etwa 1.2 ppm. Bei Acetylierung einer Hydroxylgruppe ist in der Tendenz eine Betonung des α-Effekts und eine Verringerung des β-Effekts zu erwarten[35], wobei der Effekt auf die β-Kohlenstoffe geringer ist. In der γ-Position zur Hydroxylgruppe läßt sich sogar häufig eine leichte Verschiebung zu höherem Feld beobachten. Betrachtet man die Signalveränderungen im Vergleich zur 6-Acetyl-Verbindung, ist bei ihr am α-Kohlenstoff eine ca.

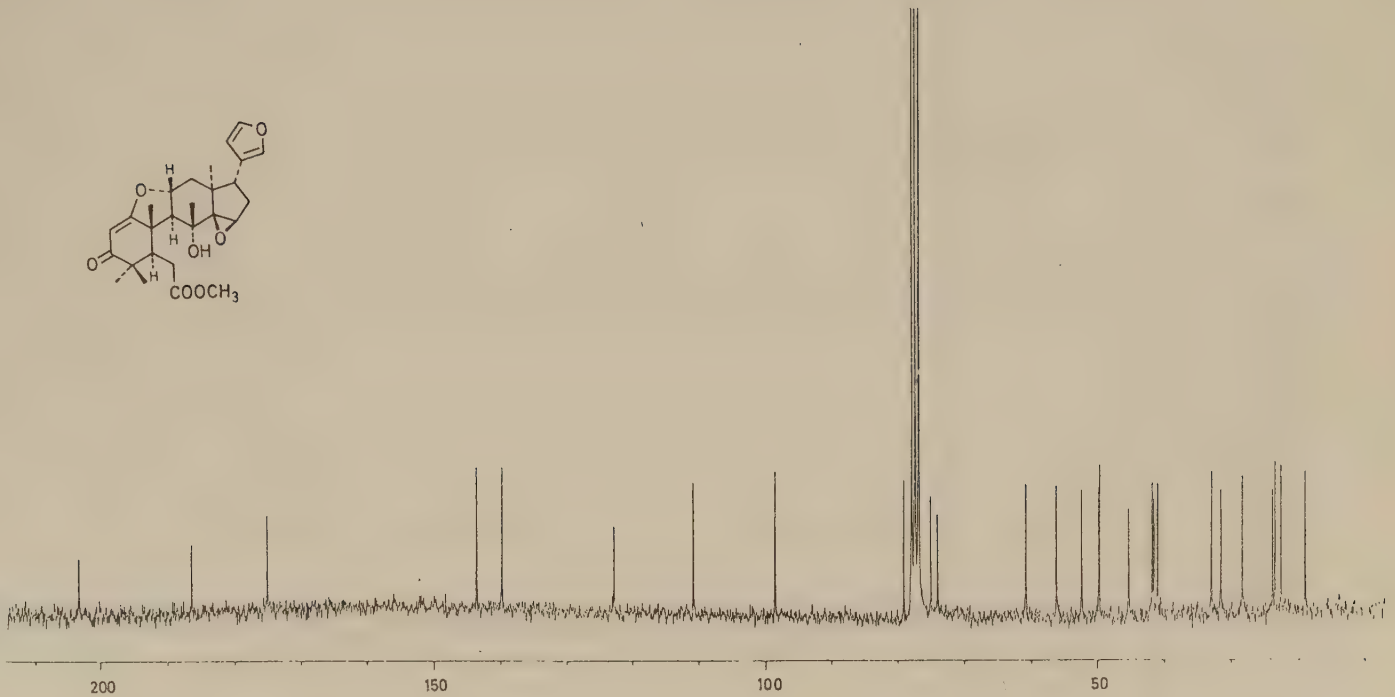


Abb. 32: Breitband-entkoppeltes ^{13}C-NMR-Spektrum des Toonaphyllins (12)

Tabelle 9: ^{13}C-NMR-Daten von Toonaphyllin (12) und 6-Hydroxytoonaphyllin (13) (δ-Werte in ppm)

	Toonaphyllin (12)		6-Hydroxytoonaphyllin (13)	
C-1	186.18	s	185.68	s
C-2	98.34	d	96.34	d
C-3	203.07	s	202.48	s
C-4	45.13	s	44.89	s
C-5	52.22	d	53.24	d
C-6	32.85	t	70.82	d
C-7	174.86	s	175.92	s
C-8	74.84	s	74.12	s
C-9	60.65	d	59.13	d
C-10	49.63	s	49.58	s
C-11	78.89	d	77.46	d
C-12	40.83	t	39.47	t
C-13	41.42	s	40.18	s
C-14	73.83	s	72.71	s
C-15	56.08	d	54.80	d
C-16	31.46	t	30.34	t
C-17	41.67	d	40.28	d
C-18	22.50	q	22.32	q
C-19	18.94	q	18.64	q
C-20	122.52	s	121.37	s
C-21	139.62	d	138.49	d
C-22	110.62	d	109.50	d
C-23	143.43	d	142.29	d
C-28	23.38	q	21.83	q
C-29	23.73	q	23.18	q
C-30	28.26	q	27.93	q
OCH_3	49.54	q	51.69	q

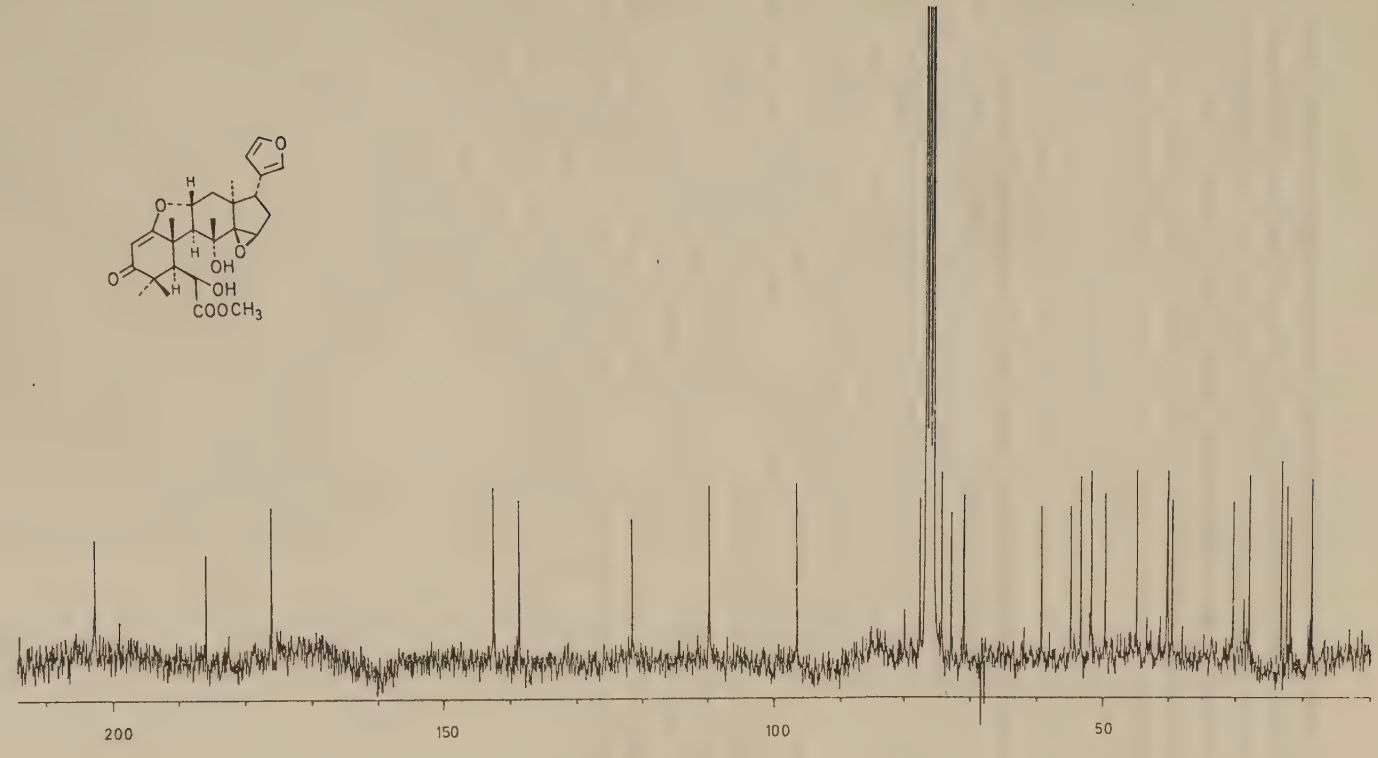


Abb. 33: Breitband-entkoppeltes ^{13}C-NMR-Spektrum von 6-Hydroxytoonaphyllin (13)

3.5 ppm stärkere und am β-Kohlenstoff eine geringfügig leichtere Tieffeld-Verschiebung zu registrieren. Von den Resonanzen der γ-ständigen C-Atome liegt die der 6-Hydroxy-Verbindung am höchsten (Tab. 10). Damit lassen sich die drei fraglichen Strukturelemente durch ihre ^{13}C-chemischen Verschiebungen gut absichern.

Tabelle 10: Unterschiedliche Lage von ^{13}C-Signalen infolge von Substitution

	C-4(γ)	C-5(β)	C-6(α)
Toonaphyllin (12)	45.13	52.22	32.85
6-Hydroxy-toonaphyllin (13)	44.89	53.24	70.82
6-Acetoxy-toonaphyllin (11)	46.03	53.17	74.21

4.4.8 Die Massenspektren der Toonaphylline

Die Bruchstückmuster der Massenspektren (Abb. 41) der drei Toonaphylline zeigen auffallende Übereinstimmung. Es liegt nahe, daraus qualitativ Strukturinformationen abzuleiten, obwohl die Zerfallsreaktionen in der Regel kompliziert verlaufen. Die Tatsache, daß sogar die relativen Intensitäten der einzelnen Bruchstücke in den drei Spektren bis zu m/e = 397 nahezu identisch sind, zeigt nicht nur, daß es sich um gleiche Gerüste handeln muß. Entsprechend dem Biemann'schen Verschiebungssatz[43] müssen auch die bei den einzelnen Substanzen verschiedenen Substituenten dort untergebracht werden, wo sie das Fragmentierungsverhalten des Gesamtmoleküls nicht beeinflussen. Das ist nur bei Substituenten an C-6 des offenen B-Ringes der Fall, wie schon mit Hilfe von NMR-Daten bewiesen wurde.

Von zahlreichen Steroiden und Triterpenoiden mit einer 1,2-En-3-on-Gruppe im Ring A ist bekannt, daß sie den Basepeak durch Spaltung des Ringes B bilden[44]. Infolge der günstigen Möglichkeit, die Ladung im konjugierten Chromophor zu stabilisieren, kann auch im vorliegenden Fall von einer Spaltung der 9/10-Bindung ausgegangen werden, zumal Ring B zwischen C-7 und C-8 bereits geöffnet ist. Die Eliminierung von C-6 und C-7 wird durch die Methylestergruppe bzw. durch 6-Substituenten (α-Spaltung) erleichtert. Demnach läßt sich der Basepeak m/e = 136 als A-Ring-Fragment formulieren.

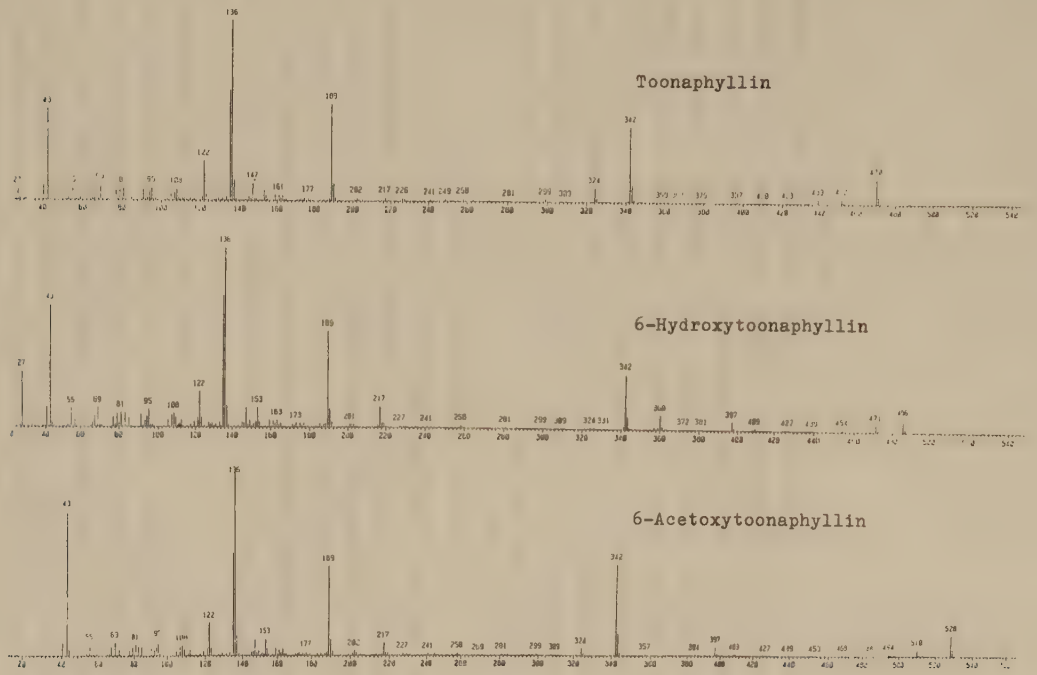
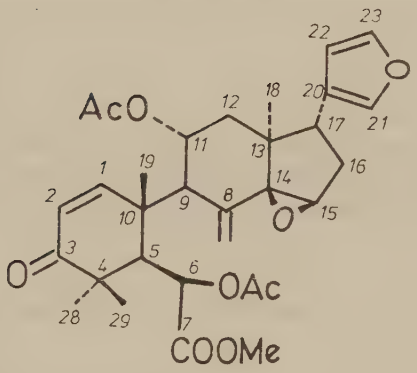


Abb. 41: Die Massenspektren der drei Toonaphylline

4.5 Strukturaufklärung von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin (14)



(14)

4.5.1 Massebestimmung, Summenformel und Schmelzpunkt

Die Molmasse wurde mittels Hochauflösung des M^+-Peaks zu 554.2513 (ber. 554.6396) bestimmt, woraus sich die Summenformel $C_{31}H_{38}O_9$ errechnet. In der Elementaranalyse wurden 67.03 % C (ber. 67.18 %) und 7.04 % H (ber. 6.91 %) gefunden. Die aus Methanol kristallisierte Substanz besitzt einen Schmelzpunkt von 193 °C.

4.5.2 Das IR-Spektrum von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin (12)
Ermittlung funktioneller Gruppen

Die beherrschende, breite Bande des IR-Spektrums (Abb. 40) von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin liegt zwischen 1765 cm^{-1} und 1745 cm^{-1}. Sie repräsentiert die Estercarbonylgruppen und

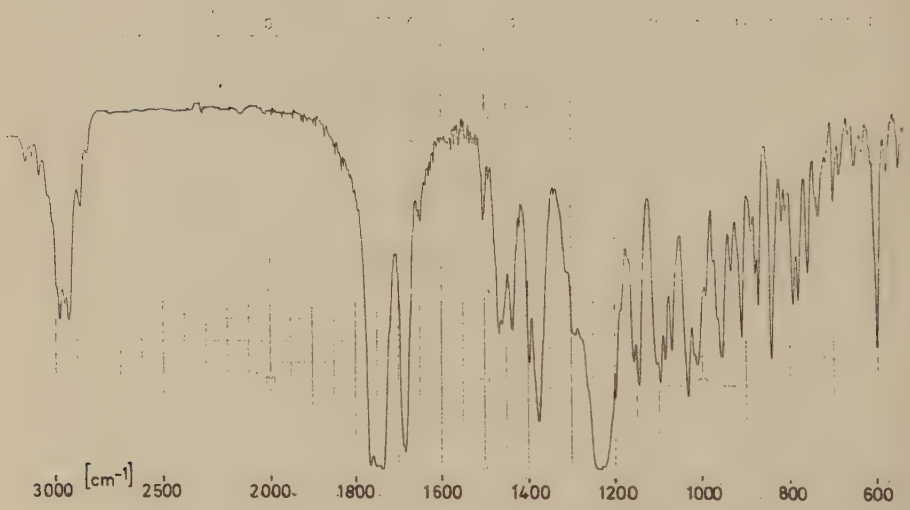


Abb. 40: IR-Spektrum von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin, Bereich von 3200 bis 550 cm^{-1}

spaltet entsprechend C-7 und den Substituenten an C-6 und C-11 dreifach auf. Zu tieferer Frequenz hin (1685 cm^{-1}) schließt sich die starke Absorption der α,β -ungesättigen Ketogruppe an. Zu dieser funktionellen Gruppe gehört auch die schwache Bande bei 3040 cm^{-1}, die in diesem Bereich von weiteren Absorptionen umgeben ist, die ebenfalls auf C=C-H out-of-plane-Schwingungen zurückzuführen sind und auf die Anwesenheit der Exomethylgruppe

(3080 cm^{-1}) und eines Furanringes (3140 cm^{-1}) hinweisen. Eine weitere Exomethylen-Bande ist bei 875 und 1650 cm^{-1} zu beobachten, die relativ gut separierte Absorption bei 1505 cm^{-1} und die charakteristische Bande bei 870 cm^{-1} deutet noch einmal auf die Existenz des Furan-Ringes hin.

4.5.3 Das ^{1}H-NMR-Spektrum von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin

Das Protonenspektrum des 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilins (Abb. 34) zeichnet sich beim ersten Betrachten durch eine ausgesprochene Armut an Kopplungsmustern aus. Breite Multipletts aufgrund von großen und zahlreichen Kopplungen fehlen fast vollständig.

Nur beim AMX-System von 16-Hα , 16-Hβ und 17-Hβ zeigen die

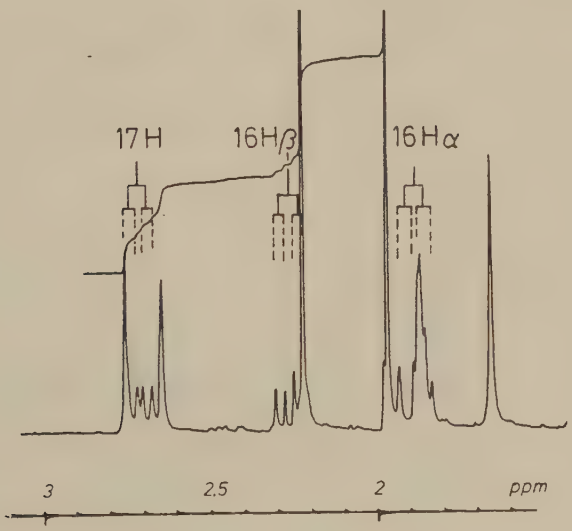


Abb. 35: 17-H, 16-Hβ und 16-Hα von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin als Drei-Spin-System

Abb. 34: 250 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin (14)

Tabelle 11: ^{1}H-NMR-Daten von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin (14) (δ-Werte in ppm, J-Werte in Hz)

1-H	7.22	d	$^3J_{1/2}$ = 10.2	
2-H	6.07	d	$^3J_{2/1}$ = 10.2	
5-H	2.75	b.s		
6-H	5.63	b.s		
9-H	2.64	s		
11-H	5.16	t	$^3J_{11/12}$ = 3.3	
12-Hα, 12-Hβ	1.86			
15-H	3.96	b.s		
16-Hα	1.88	dd	^2J = 13.6	$^3J_{16\alpha/17}$ = 10.7
16-Hβ	2.26	dd	^2J = 13.6	$^3J_{16\beta/17}$ = 6.7
17-H	2.71	dd	$^3J_{17/16\alpha}$ = 10.7	$^3J_{17/16\beta}$ = 6.7
30-H$_{(1+2)}$	5.37	b.s	und 5.28 b.s	
21-H	7.15	m		
22-H	6.17	m		
23-H	7.36	m		
18-H	0.70	s		
19-H	1.01	s		
28-H	1.40	s		
29-H	1.17	s		
-COOCH$_3$	3.70	s		
6-OAc	2.22	s		
11-OAc	1.96	s		

Signale die Aufspaltungsbilder von doppelten Dubletts mit den Kopplungskonstanten in der gewohnten Größenordnung von $^{2}J_{16/16}$ = 13.6 Hz, $^{3}J_{16\alpha/17}$ = 10.7 Hz und $^{3}J_{16\beta/17}$ = 6.7 Hz (Abb. 35). Durch Vergleich mit den anderen NMR-Spektren können auch die Signale unterhalb von 6 ppm zugeordnet werden. Es sind dies die Furanresonanzen 23-H bei 7.36 ppm, 21-H bei 7.15 ppm und 22-H bei 6.17 pmm sowie die zwei Dubletts der Enon-Protonen 1-H bei 7.24 ppm und 2-H bei 6.09 ppm mit der vicinalen Kopplungskonstanten von 10 Hz. Von den verbleibenden Signalen zwischen 6 und 2 ppm hat nur noch das bei 5.16 ppm die Form eines schmalen Tripletts, alle anderen sind mehr oder weniger breite Singuletts. Dadurch wird eine eindeutige Zuordnung (vgl. Tab. 11) durch Homodecoupling-Experimente erheblich erschwert, weil wegen der praktisch kaum vorhandenen Kopplung oft nur eine äußerst schwache Intensitätszunahme "zusammengehörender" Signale registriert werden kann.

Beim Einstrahlen bei 1.87 ppm bricht die Kopplung des schmalen Tripletts bei 5.16 ppm zusammen, umgekehrt bewirkt das Einstrahlen bei 5.16 pmm eine deutliche Veränderung nur des für zwei Protonen integrierenden Signals bei 1.87 ppm. Das Triplett (Abb. 36). Die fast fehlende Kopplung zu 9-H (2.64 ppm) beweist, daß 11-H β-ständig sein muß, der für den Tieffeld-Shift verantwortliche Acetoxy-Substituent an C-11 also α-ständig ist.

Ebenfalls stark tieffeldverschoben muß das Proton zu finden sein, das sich zusammen mit der zweiten im Molekül vorhandenen Acetoxygruppe an einem gemeinsamen C-Atom befindet. Hierbei handelt es sich um 6-H, das zusätzlich noch dem Einfluß des benachbarten Methylesters an C-7 ausgesetzt ist und deshalb bei 5.63 ppm erscheint (Abb. 36).

Die beiden im Methylenbereich liegenden verbreiterten Singuletts bei 5.28 und 5.37 ppm bleiben bei allen Entkopplungsexperimenten unbeeinflußt (Abb. 36). Es handelt sich hier um die Resonanzen der aus 8-Methyl entstandenen Exomethylengruppe (vgl. Kapitel 2). Erwartungsgemäß steckt in den beiden Signalen

nur eine sehr kleine geminale Kopplung[45], die lediglich in der verbreiterten Signalform zum Ausdruck kommt.

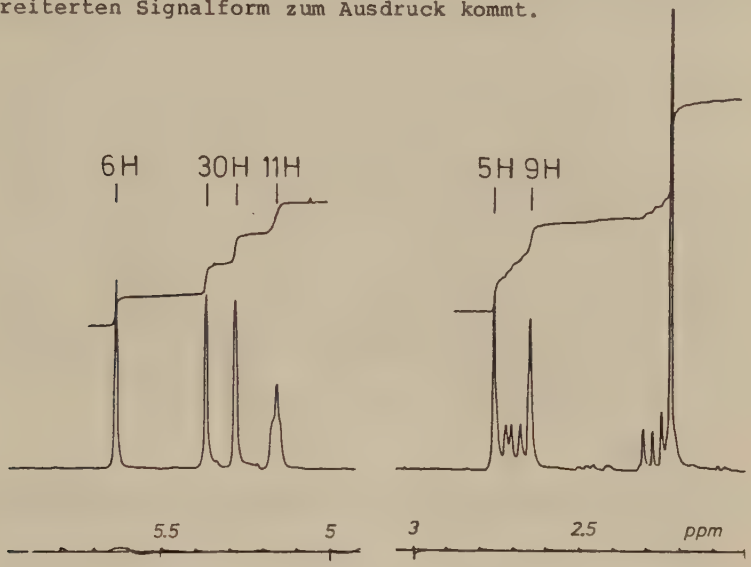


Abb. 36: Protonen-Zuordnungen im 250 MHz-^{1}H-NMR-Spektrum von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin

Die Zuordnung der vier Methylgruppen erfolgt mit ähnlichen Argumenten wie beim ausführlich diskutierten 6-Acetoxytoonaphyllin. Demnach lautet die Reihenfolge 29-H (1.40 ppm), 28-H (1.17 ppm), 19-H (1.01 ppm) und 18-H (0.70 ppm).

4.5.4 Absicherung der Zuordnungen von 5-H und 9-H

Die Zuordnung der beiden als Singuletts erscheinenden Resonanzen von 5-H und 9-H lassen sich mit Hilfe von zwei auf unterschiedliche Beträge[37] von ^{13}C-^{1}H-Kopplungskonstanten optimierten 2D-Spektren überprüfen. Im ersten Spektrum erfolgt über $^{1}J_{C-H}$ die Korrelation der ^{13}C- mit der ^{1}H-Resonanz. Entsprechend der Interpretation des Protonen-Spektrums wird C-9 das

Signal bei 55.93 ppm und C-5 das bei 46.74 ppm zugewiesen. Diese Zuordnung liegt auch deshalb nahe, weil beide Signale im Off-Resonance-Spektrum als Dubletts auftreten und C-9 üblicherweise eine stärkere chemische Verschiebung erfährt als C-5[37]. Im zweiten Spektrum werden die kleineren Kopplungskonstanten $J_{^{13}C-^{1}H}$ über zwei und mehr Bindungen sichtbar gemacht, wodurch nochmals eine Unterscheidung zwischen C-5 und C-9 und damit auch zwischen 5-H und 9-H möglich werden sollte. Tatsächlich treten bei dem C-5 zugeordneten Signal die Cross-Peaks für die Methylgruppen 28-H und 29-H hervor, während bei dem C-9 zugeordneten Signal die Kreuzungspunkte für 11-H und 19-H sichtbar werden. Damit ist die Zuordnung eindeutig und die diesbezügliche Interpretation des ^{1}H-Spektrums bestätigt.

4.5.5 Das ^{13}C-NMR-Spektrum von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin

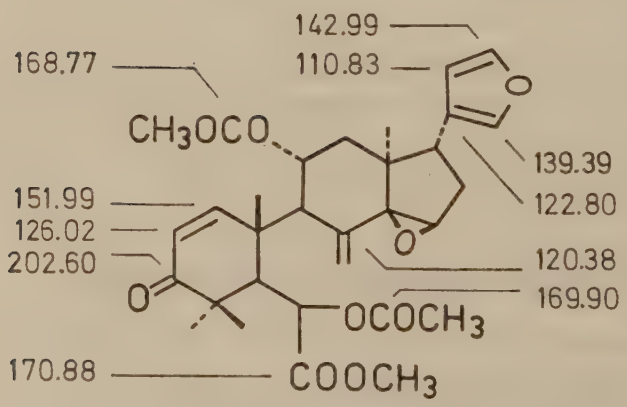


Abb. 37: ^{13}C-Zuordnungen unter 100 ppm

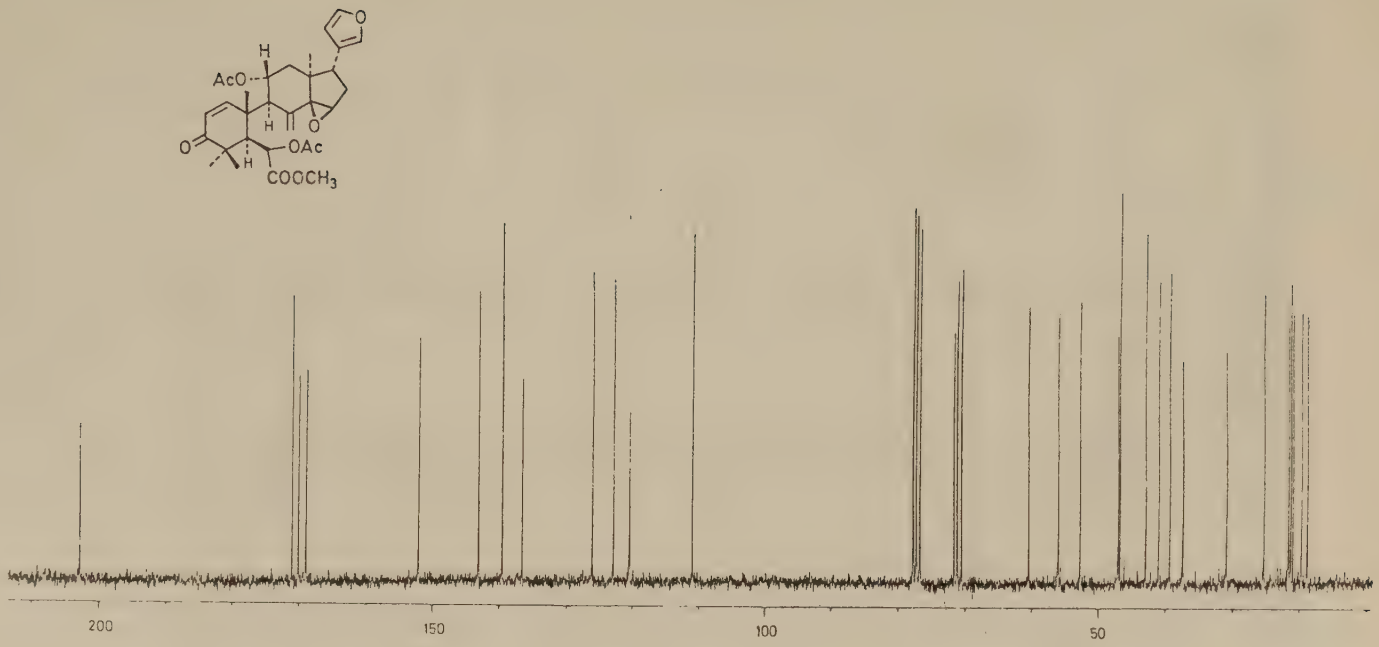


Abb. 39: ^{13}C-NMR-Spektrum von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin (12)

Tabelle 12: ^{13}C-NMR-Daten von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin (14) (δ-Werte in ppm)

C-1	151.99	(d)
C-2	126.02	(d)
C-3	202.62	(s)
C-4	47.0	(s)
C-5	46.74	(d)
C-6	71.12	(d)
C-7	170.88	(s)
C-8	136.39	(s)
C-9	55.93	(d)
C-10	42.91	(s)
C-11	70.46	(d)
C-12	37.32	(t)
C-13	40.93	(s)
C-14	71.52	(s)
C-15	60.40	(d)
C-16	30.83	(t)
C-17	39.26	(d)
C-18	18.76	(q)
C-19	19.56	(q)
C-20	122.80	(s)
C-21	139.39	(d)
C-22	110.83	(d)
C-23	142.99	(d)
C-28	21.53	(q)
C-29	25.18	(q)
C-30	120.38	(t)
6-OAc	169.90	(s)
11-OAc	168.77	(s)
OCH_3	52.64	(q)

Im Bereich unter 100 ppm befinden sich zwölf ^{13}C-Resonanzen, die aufgrund charakteristischer chemischer Verschiebungen und Multiplizitäten zugeordnet werden können (Abb. 37). Weit abgesetzt bei 202.6 ppm liegt das Signal eines Enon-Kohlenstoffs, der folglich C-3 zugeordnet wird. Dicht um 170 ppm erscheinen drei Singuletts, die Estercarbonyl-Kohlenstoffen zugeteilt werden müssen. Das tiefste bei 170.88 ppm gehört zum Methylester-Kohlenstoff C-7, die beiden anderen (169.90 und 168.77 ppm) gehören zu den Acetoxy-Substituenten an C-6 und C-11. Die Resonanzen von C-1 und C-2 befinden sich bei 151.99 und 126.02 ppm. Während erstere relativ gut separiert ist und somit aufgrund ihrer chemischen Verschiebung zugeordnet werden kann, ist die zweite dank ihrer Aufspaltung im Off-Resonance-Spektrum zum Dublett gut von den benachbarten Signalen zu unterscheiden. Diese treten dort nämlich als Singulett bzw. Triplett auf und repräsentieren damit C-20 (122.80 ppm) des Furans und C-30 (120.38 ppm) der Exomethylengruppe, dem einzigen Triplett bei so tiefem Feld. Die vier verbleibenden Peaks, drei Dubletts und ein Singulett, müssen noch auf Furan-Kohlenstoffe und auf C-8 verteilt werden. Von den drei Dubletts wird das bei tiefstem Feld vorkommende dem α-Furan-Kohlenstoff C-23 (142.99 ppm) zugewiesen, gefolgt von C-21 (139.39 ppm) und C-22 (110.83 ppm), das β-Position einnimmt. Das quartäre C-8 erscheint als Singulett bei 136.39.

Nahe 70 ppm befindet sich eine Dreiergruppe von Sauerstoff tragenden C-Atomen. Von diesen wird das Signal eines quartären Kohlenstoffs C-14 zugeteilt, die anderen beiden werden den Acetoxy-Substituenten C-6 und C-11 zugewiesen, wobei für C-6 eine stärkere chemische Verschiebung wegen des 7-Methylesters zu erwarten ist. Die Zuordnung der Resonanzen von 61 bis 17 ppm sind in Tabelle 12 aufgeführt. Sie wurden durch ein ^{13}C-^{1}H-korreliertes Spektrum überprüft, mit dessen Hilfe auch die Lage der einzelnen Methyl-Kohlenstoffe eindeutig festgelegt werden konnte (Abb. 38).

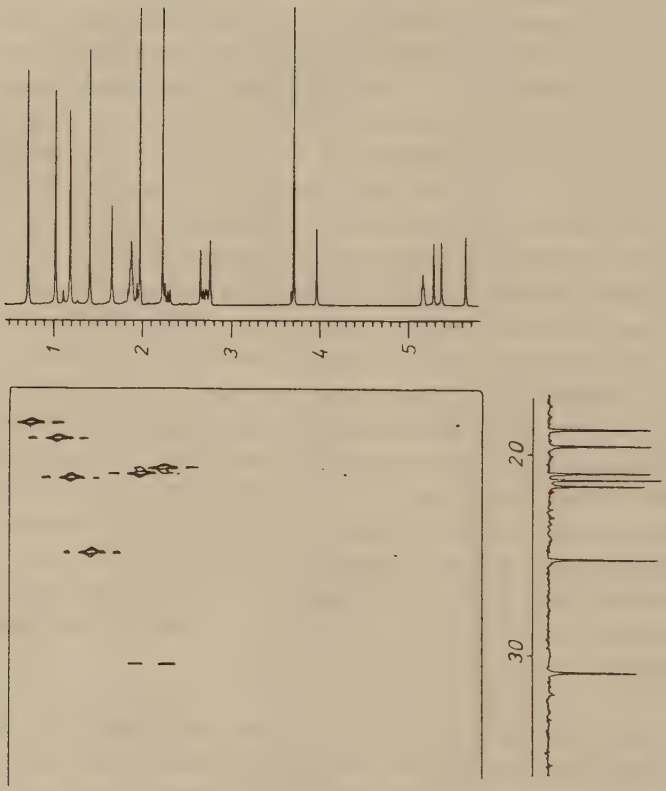


Abb. 38: ^{13}C-^{1}H-korreliertes Spektrum von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin im Bereich der Methylresonanzen

5. PRÜFUNG DER ISOLIERTEN TRITERPENOIDE AUF FRASSHEMMENDE WIRKUNG

5.1 Testmethode

Zur Prüfung der isolierten Inhaltsstoffe auf fraßhemmende und entwicklungsbeeinflussende Eigenschaften dienten Larven des mexikanischen Bohnenkäfers Epilachna varivestis Muls. (Coleoptera, Cocchinellidae) im L_4-Stadium. Sie bieten sich für solche Versuchszwecke in zweifacher Hinsicht an. Zum einen erweisen sich die Larven als besonders gefräßig, zum anderen ist ihre Aufzucht und Haltung relativ unproblematisch und ihre Versorgung mit Bohnenblättern[46] verhältnismäßig leicht sicherzustellen[47].

Zur Vorbereitung der Tests werden die Bohnenblätter halbseitig mit einer methanolischen Lösung der zu testenden Substanz, auf der anderen Blatthälfte mit reinem MeOH bepinselt und danach sofort mit einem Fön getrocknet. Die so präparierten Blätter werden über einem angefeuchteten Filterpapier in Petrischalen gelegt. Darüber kommt eine Lochmaske, die eine definierte Fläche des Blattes den Versuchstieren zum Fressen zu Verfügung stellt. Bei der Positionierung ist darauf zu achten, daß die von der Maske unbedeckte Fläche sich aus gleichen Anteilen der beiden Blatthälften zusammensetzt. In jede Schale werden zwei L_4-Larven gebracht, die dort zwölf Stunden lang verbleiben.

5.2 Testergebnisse

Unter den genannten Versuchsbedingungen wurden die isolierten Triterpenoide in verschiedenen Konzentrationen getestet. Während bei Konzentrationen von 0.05 % und weniger sich keine fraßhemmenden Eigenschaften mehr nachweisen ließen, zeigte sich bei 0.1 %igen und 0.2 %igen Testlösungen geringe Antifeeding-Aktivität.

Die Testergebnisse bei 0.1 % Konzentration sind in Tabelle 13 zusammengestellt, dabei wurde der durchschnittliche Anteil an gefressener Blattfläche abgeschätzt und als Blattfraß in % angegeben.

Tabelle 13

Substanz	Blattfraß (%)
11α-i-Butyroxyneotrichilenon (9)	50
6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron (10)	50
6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin (14)	50
Toonaphyllin (12)	35
6-Acetoxytoonaphyllin (11)	40
Kontrolle	95

Wegen der nur wenig fraßabschreckenden Wirkung (Abb. 42) der Substanzen wurde nach dem Fraß die weitere Entwicklung von drei Testgruppen und einer Kontrollgruppe von je zehn Tieren beobachtet. Dazu wurden die Larven wieder in Käfige überführt und mit unbehandelten Bohnenblättern weitergefüttert.

Während sich die Kontrollgruppe völlig normal verpuppte und nach der Metamorphose die Käfer keinerlei Defekte aufwiesen, stellten sich bei den Testgruppen deutliche Metamorphosestörungen ein. Sie äußerten sich in Mißbildungen bei den Käfern, manche Käfer konnten ihre Puppenhüllen nicht vollständig verlassen, und bei einer Gruppe wurde die Verpuppung sogar vollkommen gehemmt. In Tabelle 14 sind die bei den vier Gruppen gemachten Beobachtungen dargestellt.

Tabelle 14: Entwicklungsstörungstest

Entwicklungszeit	Kontrolle	Toonaphyllin (12)	6-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron (10)	6-Acetoxy-12-deacetoxy-toonacilin (14)
nach 2 Tagen	alle Larven lebend	alle Larven lebend	alle Larven lebend	alle Larven lebend
nach 11 Tagen	9 Puppen 1 Käfer ohne Defekt	10 Puppen	2 tote Larven 8 Puppen	4 tote Larven 6 lebende Larven
nach 13 Tagen	restl. 9 Käfer ohne Defekte	5 Käfer ohne Defekte 2 Käfer leicht verkrüppelt 3 Käfer stark verkrüppelt	2 Käfer ohne Defekte 6 Puppen	6 noch lebende Larven
nach 16 Tagen	alle Käfer lebend		6 Käfer stark verkrüppelt	alle Larven tot

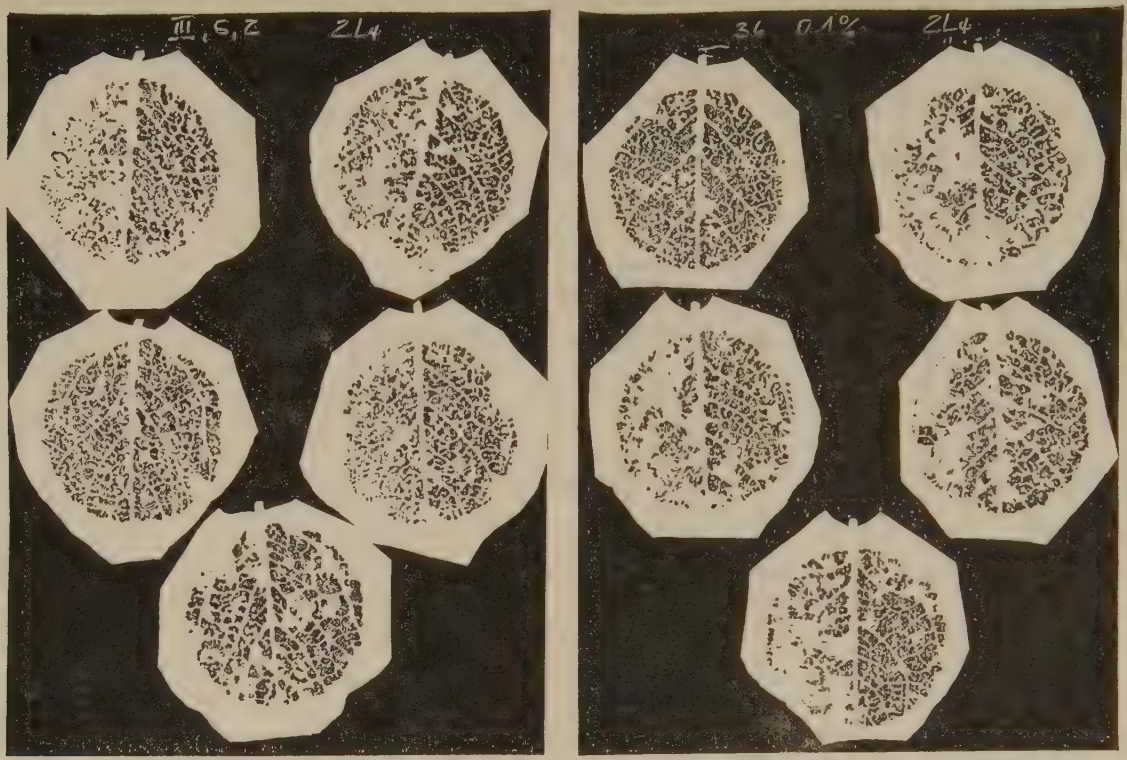


Abb. 42: Fraßtest mit 6-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron (links) und Toonaphyllin (rechts). Die jeweils linke Blatthälfte ist mit 0.1 %iger Lösung behandelt. Die weitere Entwicklung der Tiere aus diesem Test wurde beobachtet (vgl. Tabelle 14, Entwicklungsstörungstest).

6. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wird die Isolierung und Strukturaufklärung neuer triterpenoider Inhaltsstoffe aus den Blättern von Toona ciliata var. Australis (Meliaceae) beschrieben. Das bearbeitete Pflanzenmaterial stammte aus der Nähe von Brisbane, Queensland (Australien). Die Untersuchung auf Triterpenoide wurde unter dem besonderen Aspekt biologischer Wirksamkeit, insbesondere fraßhemmender Eigenschaften auf Insekten geführt. Als geeignete Versuchstiere für Fraßtests dienten Larven des mexikanischen Bohnenkäfers Epilachna varivestis Muls. (Coleoptera, Coccinellidae).

Die Isolierung der Inhaltsstoffe erfolgte durch chromatographische Auftrennung von Etherextrakten getrockneter Blätter. Die Vortrennungen wurden mit Hilfe großer Mitteldruck-Säulen an Kieselgel durchgeführt, während für die endgültige Auftrennung HPLC-Methoden angewandt wurden. Orientiert am Trennproblem fanden Hochleistungssäulen mit Silicagel und chemisch gebundenen Octadecyl- und Nitril-Phasen Verwendung.

Die Aufarbeitung der Blattextrakte lieferte sechs neue Triterpenoide: 11α-i-Butyroxyneotrichilenon (9), 6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron (10), 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin (14) und drei B-seco-Tetranortriterpenoide, die nicht von bestehenden Strukturen abgeleitet werden konnten. Für sie werden die Namen Toonaphyllin (12), 6-Hydroxytoonaphyllin (13) und 6-Acetoxytoonaphyllin (11) vorgeschlagen.

Die Aufklärung der Strukturen erfolgte mit Hilfe von ^{1}H- und ^{13}C-Kernresonanz-Spektroskopie, IR- und Massenspektroskopie.

Das 11α-i-Butyroxyneotrichilenon (9) besitzt ein tetracyclisches Ringgerüst, dessen Verknüpfung durch ^{1}H-NMR-Spektroskopie und NOE-Messungen geklärt wurde. Basierend auf Nuclear-

Overhauser-Experimenten konnte auch nachgewiesen werden, daß Ring C in Halbsesselkonformation vorliegt und nicht mehr, wie im 7-Acetylneotrichilenon, die dort stabilere Sesselform einnimmt. Der Grund für die Konformationsänderung wurde mit den sterischen Verhältnissen um den raumbeanspruchenden i-Butyroxy-Substituenten erklärt. Alle ^{1}H- und ^{13}C-NMR-Signale wurden zugeordnet und die Kopplungsverhältnisse ermittelt. Durch Computersimulation und -Iteration sämtlicher Spinsysteme der Gerüstprotonen wurde die ^{1}H-NMR-Interpretation zusätzlich abgesichert.

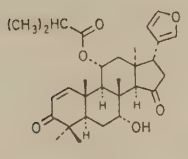
Mit 6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron wurde das erste Azadironderivat isoliert. Zwar sind Inhaltsstoffe mit ähnlichen Strukturen schon seit längerem bekannt, häufig fehlen aber ^{13}C-NMR-Spektren oder bestehen Unsicherheiten bei der Zuordnung der Methyl-Kohlenstoffe. Im vorliegenden Fall wurde mit Hilfe eines zweidimendionalen ^{13}C-^{1}H-korrelierten Spektrums die Lage der Kohlenstoff-Resonanzen vollständig und zweifelsfrei bestimmt.

Die vier weiteren Inhaltsstoffe sind B-seco-Terpenoide. Deren ^{1}H- und ^{13}C-Signale wurden auch hier vollständig zugeordnet und die sterischen Verhältnisse anhand von NOE-Spektren geklärt. Die Ursachen für die auffallende Tieffeld-Lage von Methyl-Resonanzen im ^{1}H-NMR-Spektrum des 6-Acetoxytoonaphyllins konnten erklärt werden. Nuclear-Overhauser-Experimente lieferten hierfür Informationen. Die Computer-Simulation diente auch hier zur zusätzlichen Verifizierung der ^{1}H-Spektren-Interpretation.

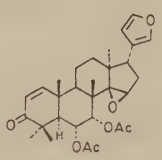
Biogenetisch sind die sechs neuen Tetranortriterpenoide vom Tirucallol (bzw. vom 20Hβ-isomeren Euphol) ableitbar. Wie gezeigt wurde, besitzen alle einen α-ständigen Furanring an C-17, entstanden durch oxidativen Abbau der Seitenkette unter Verlust von vier C-Atomen. Während 11α-i-Butyroxyneotrichilenon und 6α-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron tetracyclische Ringsysteme aufweisen, finden sich bei den vier anderen B-seco-Strukturen, entstanden durch Bindungsbruch zwischen C-7/C-8.

Beim Toonafolin, einem von Grimminger ebenfalls aus Toona-Blättern isolierten Tetranortriterpenoid, ist Ring B zum ε-Lacton aufoxidiert. Die Lacton-Struktur darf somit auch biochemisch als die Vorstufe der hier beschriebenen B-seco-Verbindungen angesehen werden. Lacton-Öffnung und Veresterung führen zur Hydroxylfunktion an C-8 und zur Methylestergruppe an C-7, den Strukturelementen der hier beschriebenen Toonaphylline. Im nächsten Schritt, der Wasserabspaltung an C-8, formal durch Protonierung der Hydroxylgruppe, entsteht aus der 8-Methylgruppe die Exomethylenfunktion, wie sie für 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin (14) bewiesen wurde.

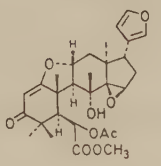
Die Prüfung der biologischen Wirksamkeit der isolierten Triterpenoide ergab zwar nur relativ geringe Antifeeding-Aktivität, aber die beim Fraß aufgenommenen Wirkstoffe führten zu erheblichen Störungen im Metamorphoseablauf. Während sich bei den Tests die Kontroll-Tiere völlig normal entwickelten, reichten die Schädigungen bei den Test-Tieren von leichten Mißbildungen der Käfer nach der Verpuppung bis zur vollständigen Hemmung des Verpuppungsvorganges.



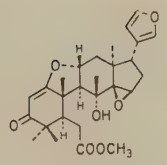
(9)



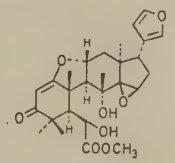
(10)



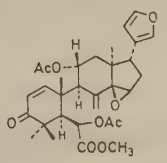
(11)



(12)



(13)



(14)

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L

7.1 Verwendete Geräte

^{1}H-NMR-Spektren: Bruker WM 250
250 MHz, Lösungsmittel $CDCl_3$, TMS als innerer Standard

^{13}C-NMR-Spektrem: Bruker WM 250
62.89 MHz, Lösungsmittel $CDCl_3$, bei Verwendung eines inneren Standards: TMS

Masssenspektren: Varian MAT 311A, Varian MAT 44S

IR-Spektren: Zeiss IMR 25 Spektralphotometer, von allen sechs Triterpenoiden wurden KBr-Preßlinge hergestellt

Schmelzpunkte: Büchi SMP 20 (Syst. Tottoli)
Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert

Dünnschichtchromatographie:
Merck DC-Alufolien Kieselgel 60 F_{254}.
Entwicklung in Desaga-Trogkammern

Flüssig-Chromatographie: Präparative und analytische Trennungen wurden an selbst zusammengestellten Geräten durchgeführt.

Mitteldruck-Chromatographie:
Pumpe: Orlita-Dreikopfmembranpumpe M3S4
Probenaufgabe: Latek Sample Injection Valve R60SV
Detektor: Schoeffel-UV-Spektrometer SF 770

Säule: Glassäule mit Sorptionsmittel LiChroprep Si 60, 40-63 µm, Inhalt 960 g
Latek-Glassäulen mit Sorptionsmittel LiChroprep Si 60 25-40 µm, Inhalt 135 g
und mit LiChroprep RP 18, 25-40 µm, Inhalt 135 g

Hochdruck-Chromatographie:

Pumpe: Latek P400, Gynkothek 600/300
Probenaufgabe: Waters U6K
Detektor: Schoeffel-UV-Spektrometer SF 770
Säule: Fertigsäulen aus Stahl von Knauer (16x200 mm) und von Bischoff (20x250 mm), mit Sorptionsmitteln LiChroprep Si 60, 10 µ und LiChroprep RP 18, 7 µ

Lösungsmittel für die Chromatographie:
Alle Fließmittel wurden vor ihrer Verwendung über leistungsfähige Füllkörperkolonnen destilliert.

7.2 Pflanzenmaterial

Die Blätter von Toona ciliata var. australis (Meliaceae) wurden im Oktober 1976 bei Brisbane (Australien) in einer Versuchsstation des Forestry Department of Queensland gesammelt und dort luftgetrocknet. Danach wurden sie in einem trockenen Raum bei Raumtemperatur bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

7.3 Extraktion

Die Blätter wurden in einer Brabender Heumühle staubfein zermahlen. 7,2 kg Mahlgut wurden in drei Teilen je 36 Stunden lang mit Ether im Soxhlet-Verfahren extrahiert. Nach dem Extraktionsvorgang wurde das Lösungsmittel am Rotations-Verdampfer abgezogen, es verblieben insgesamt 291 g Rohextrakt.

7.4 Verteilungs-Chromatographie

Zunächst wurden die Ether-Rohextrakte zur Entfernung unpolarer Anteile je dreimal einer Flüssig-Flüssig-Verteilung zwischen Petrolether/Methanol/Wasser 50 : 45 : 5 unterworfen. Anschließend wurde die Methanol-Phase nach Abziehen des Lösungsmittels zur Befreiung von stark polaren Komponenten zwischen Wasser/Essigester 50 : 50 verteilt. Nach der Reinigungsoperation verblieben insgesamt 91.5 g dunkelbrauner Extrakt.

7.5 Vorfraktionierung an 960 g-Säule

Der vorgereinigte Extrakt aus einer Soxhlet-Füllung (30 g) wurde an einer großen Glassäule (stationäre Phase Kieselgel Si 60, 40-63 µ) in acht Teilen chromatographiert. Als mobile Phase wurde ein Stufengradient aus Petrolether/Essigester, Zusammensetzung 9 : 1 bis 4 : 6, gewählt.

Zunächst wurden jeweils fünf Vorfraktionen gesammelt, die noch viel Wachse und Fette enthielten. Aus der dünnschichtchromatographischen Begleitung der Trennung konnte ersehen werden, daß die folgenden zwölf Fraktionen Terpenoide enthielten. Davon wurden die Fraktionen 5, 6, 7 und 11 weiter aufgetrennt.

7.6 Isolierung von 6-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron (10)

Aus Fraktion 5 (1.1 g) wurden mit Methanol 410 mg einer fast reinen Substanz auskristallisiert. Davon wurden 160 mg zur weiteren Reinigung an HPLC-Säulen chromatographiert. Die erste Trennung PE/EE 75/25, die zweite an LiChroprep RP 18 (7 µ) mit MeOH/H_2O 8/2 als Fließmittel. Es wurden 130 mg Reinsubstanz erhalten. Schmp. 214 °C (krist. aus MeOH).

MS: 510 (2 %, M^+); 43 (100 %, M minus $COCH_3$); 408 (60 %); 245 (47 %); 71 (36 %); Ring-C/D-Fragmente mit Furan: 163 (23 %); 94 (31 %); 219 (19 %); Ring D-Fragmente mit Furan: 95 (30 %); 107 (19 %).

IR: (KBr, cm^{-1}) 1745 cm^{-1} (Estercarbonyl), 1675 (α,β -ungesätt. Keton); 1250, 1045, 880 (Furan).

^{1}H-NMR: Abb. 17, Interpretation Tab. 3
^{13}C-NMR: Abb. 21, Interpretation Tab. 4

7.7 Isolierung von 6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin (14)

Fraktion 6 (855 mg) wurde zur weiteren Auftrennung an HPLC-Stahlsäulen zuerst an RP 18-Material und darauffolgend an Silicagel mit den Eluentengemischen MeOH/H_2O 8/2 bzw. Petrolether/Essigester 7/3 chromatographiert. Insgesamt wurden 135 mg reine Substanz erhalten. Schmp. 193 °C (krist. aus MeOH).

MS: 554 (1.5 %, M^+); 43 (100 %, $COCH_3$); Ring A-Fragmente: 207 (86 %); 267 (64 %); 137 (44 %); 225 (25 %); Ring C und D-Fragmente mit Furan: 287 (10 %); Ring D-Fragmente mit Furan: 107 (18 %); 95 (14 %).

IR: (KBr, cm^{-1}) 3080 (Exomethylen); 1765-1745 (drei Estercarbonyle); 1685 (α,β -ungesätt. Keton); 1255, 1050, 875 (Furan).

^{1}H-NMR: Abb. 41, Interpretation Tab. 11
^{13}C-NMR: Abb. 64, Interpretation Tab. 12

7.8 Isolierung von 11α-i-Butyroxyneotrichilenon (9)

Fraktion 7 (910 mg) wurde noch zweimal an Silicagel Si 60 mit den mobilen Phasen PE/EE 7/3 und 65/35 chromatographiert, der letzte Reinigungsvorgang an RP 18-Phase ($MeOH/H_2O$ 7/3) ergab 115 mg reine Substanz, die aus Methanol kristallisiert werden konnte. Schmp. 191 °C.

MS: 496 (5 %, $M^{+,}$); 43 (100 %, $COCH_3$): 408 (52 %, M - $(CH_3)_2$ CHCOO); 245 (61 %); 71 (42 % M - $COCH(CH_3)_2$); 94 (31 %, Ring D mit Furan-Fragment); 163 (30 %, Ring C/D mit Furan-Fragment).

^{1}H-NMR: Abb. 10, Interpretation Tab. 1
^{13}C-NMR: Abb. 16, Interpretation Tab. 2

IR: (KBr, cm^{-1}) 3480 (OH), 1225 (Estercarbonyl und Keton), 1675 (α,β -ungesätt. Keton), 1050, 875 (Furan).

7.9 Isolierung der Toonaphylline

Fraktion 11 (910 mg) wurde mehrfach an HPLC-Säulen wechselweise an Kieselgel Si 60 und Rp 18-Material chromatographiert. Als Fließmittel für die polare stationäre Phase fanden Petrolether/Essigester-Gemische im Verhältnis 60 : 40 und 55 : 45 Verwendung, für die unpolare stationäre Phase wurden $MeOH/H_2O$ in der Zusammensetzung 70/30 und 65/35 eingesetzt. Es konnten die drei Substanzen Toonaphyllin, 6-Acetoxytoonaphyllin und 6-Hydroxytoonaphyllin rein erhalten werden.

Toonaphyllin (12), reine Substanz 40 mg, Schmp. 141 °C (krist. aus MeOH).

MS: 470 (17 %, M^+), 136 (100 %, Ring A-Fragment), 189 (55 %, Ring C/D-Fragment mit Furan), 342 (42 %, M - COOMe und Furan), 43 (49 % $COCH_3$), 122 (18 %).

^1H-NMR: Abb. 33, Interpretation Tab. 7
^{13}C-NMR: Abb. 39, Interpretation Tab. 9

6-Hydroxytoonaphyllin (13), reine Substanz 12 mg (krist. aus Methanol), Schmp. 146 °C.

MS: 486 (8 %, M^+), 136 (100 %, Ring A-Fragment), 43 (69 %, $COCH_3$), 189 (56 %, Ring C/D mit Furan-Fragment), 342 (32 % minus $COOCH_3$, H_2, Furan), 122 (19 %), 217 (12 % Ring C/D-Fragment minus H_2O).

^1H-NMR: Abb. 37, Interpretation Tab. 8
^{13}C-NMR: Abb. 40, Interpretation Tab. 9

6-Acetoxytoonaphyllin (11), reine Substanz 95 mg, (krist. aus Methanol), Schmp. 157 °C.

MS: 528 (8 %, M^+), 136 (100 %, Ring A-Fragment), 43 (77 %, $COCH_3$), 189 (55 % ring C/D mit Furan-Fragment), 342 (40 %, M - 2x $COOCH_3$, Furan), 122 (19 %), 217 (6 %, Ring C/D-Fragment minus H_2O).

IR: (KBr, cm^{-1}) 3440 (OH), 1750 (Estercarbonyle), 1640 (α,β - ungesätt. Keton), 1620 (C=C-O Valenzschw.).

^1H-NMR: Abb. 28, Interpretation Tab. 6
^{13}H-NMR: Abb. 27, Interpretation Tab. 8

7.10 Angaben zur Dünnschichtchromatographie

Die Rf-Werte der isolierten Substanzen betragen für das Fließmittelsystem PE/EE 6/4:

6-Acetoxy-14,15-epoxyazadiron (10)	0.45
11α-i-Butyroxyneotrichilenon (9)	0.42
6-Acetoxy-12-deacetoxytoonacilin (14)	0.34
6-Acetoxytoonaphyllin (11)	0.27
Toonaphyllin (12)	0.21
6-Hydroxytoonaphyllin (13)	0.17

8. LITERATURVERZEICHNIS

1) R. Steets, Dissertation, Universität Gießen 1976

2) S. D. Joland, R.M. Wiedkopf und J. R. Cole, J. Pharm. Sciences 66, 889 (1977)

3) J. A. Veech, "Plant Resistance to Nematodes", in: B. M. Zuckermann, R. A. Rohde (Hrsg.), Plant Parasitic Nematodes Vol. 3 (1981), Academic Press New York, London, S. 377

4) a) M. W. Kahn, M. M. Alam, A. M. Kahn und S. K. Saxena, Acta Bot. Ind. 2, 120 (1974)
   b) M. M. Alam, A. Masood und J. Husain, Ind. J. Exp. Biol. 13, 412 (1975)

5) M. Bokel, Dissertation, Universität Tübingen 1980

6) W. Grimminger, Dissertation, Universität Tübingen 1978

7) K. Kypke, Dissertation, Universität Hohenheim 1980

8) A. Mondon und B. Epe, in: Fortschritte d. Chem. org. Naturst. 44, Springer-Verlag Wien, New York 1983, S. 100

9) H. R. Schütte, Biosynthese niedermolekularer Naturstoffe, G. Fischer-Verlag Stuttgart, New York 1982, S. 74

10) J. D. Connolly und K. H. Overton, Chemistry of Terpenes and Terpenoids, Academic Press London and New York 1972, S. 207

11) G. P. Cotterrell, T. G. Halsall und M. J. Wriglesworth, J. Chem. Soc. (C) 1970, 739

12) a) J. G. St. C. Buchanan und T. G. Halsall, J. Chem. Soc. (C) 1970, 2280
   b) G. P. Cotterrell, T. G. Halsall und M. J. Wriglesworth, Chem. Comm. 1967, 1121

13) a) D. Lavie, E. C. Levy und M. K. Jain, Tetrahedron 27, 3927 (1971)
   b) D. Lavie und E. C. Levy, Tetrahedron 27, 3941 (1971)
   c) D. A. Okorie und D. A. H. Taylor, J. Chem. Soc. (C), 1968, 1828

14) J. D. Connolly, I. M. S. Thornton und D. A. H. Taylor, J. C. S. Perkin I, 1973, 2407

15) W. Kraus, K. Kypke, M. Bokel, W. Grimminger, G. Sawitzki und G. Schwinger, Liebigs Ann. Chem. 1982, 87

16) W. Kraus, und W. Grimminger, Liebigs Ann. Chem. 1981, 1838

17) D. Lavie, E. C. Levy und R. Zelnik, Bioorganic Chemistry 2, 59 (1972)

18) A. Mondon und B. Epe, Lit 8), S. 162

19) a) W. Grimminger, Lit 6), S. 9
b) A. Merrien und J. Polonsky, Chem. Comm. 1971, 261

20) a) J. H. Butterworth und E. D. Morgan, Chem. Comm. 1968, 23
b) J. H. Butterworth, E. D. Morgan und G. R. Percy, J. C. S. Perkin I, 1972, 2445
c) P. R. Zanno, I. Miura, K. Nakanishi und D. L. Elder, J. Amer. Chem. Soc. 97, 1975 (1975)

21) Dem Department of Forestry, Brisbane, Queensland (Australien) danke ich für die Beschaffung des Pflanzenmaterials

22) W. R. Chan, J. A. Gibbs und D. R. Taylor, Chem. Comm. 1967, 720

23) R. Cramer, Dissertation, Universität Tübingen 1979, S. 86

24) D. H. Williams, I. Fleming und B. Zeeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Thieme-Verlag Stuttgart 1971, S. 109

25) H. Günther, NMR-Spektroskopie, Thieme-Verlag Stuttgart 1973, S. 310

26) PANIC-Spinsimulationsprogramm, BRUKER-Software-Sammlung für aspect 2000

27) E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl und W. Simon, Strukturaufklärung organischer Verbindungen, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 1981, S. C235

28) Herrn Wurmstich, Tübingen, danke ich für die Durchführung der Elementaranalysen

29) J. D. Connolly und K. H. Overton, Progress in Phytochemistry II, 383 (1970)

30) B. Saikia, J. C. S. Kataky, R. K. Mathur und J. N. Baruah, Indian J. Chem. 1978, 1042

31) K. Kypke, Lit 7), S. 46

32) a) N. S. Ohochuku und D. A. H. Taylor, J. Chem. Soc. (C) 1970, 421
b) D. A. H. Taylor, Private Mitteilung
33) D. Lavie, E. C. Levy und R. Zelnik, Bioorganic Chem. 2 59 (1972)
34) J. D. Connolly, C. Labbé, D. S. Rycroft und D. A. H. Taylor, J. Chem. Soc. Perkin I, 1979, 2959
35) J. W. Blunt und J. B. Stothers, Org. Magn. Res. 9, 439 (1977)
36) D. H. Williams, I. Fleming und B. Zeeh, Lit 25) S. 67
37) E. Pretsch, T. Clerc, J. Seibl und W. Simon, Lit 28) S. 130
38) M. Hesse, H. Meier und B. Zeeh, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, Thieme-Verlag Stuttgart 1979, S. 77
39) W. F. Wehrli und T. Nishida, in:Fortschritte d. Chem. org. Naturst. 36, Springer-Verlag Wien, New York 1979, S. 80
40) D. A. H. Taylor, Private Mitteilung
41) Herrn Dr. U. Siehl, Tübingen, danke ich für die Aufnahme des 400 MHz-^{1}H-NMR-Spektrums
42) T. G. Halsall und J. A. Troke, J. Chem. Soc. Perkin I, 1975, 1785
43) H. Budzikiewicz, Massenspektrometrie, Verlag Chemie 1980, S. 140
44) H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, Sturcture Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry II, Holden Day, San Francisco, London, Amsterdam 1964, S. 87
45) H. Günther, NMR-Spektroskopie, Thieme-Verlag Stuttgart 1973, S. 106
46) Ich danke Herrn Prof. Dr. F. Mechelke, Institut für Genetik der Universität Hohenheim, für das Überlassen von Gewächshausfläche
47) Frau P. Bärtl danke ich für die Aufzucht der Larven und der Bohnenpflanzen

L E B E N S L A U F

Erwin Martin Keil

geboren am 30.12.1947 in Waldstetten
Vater: Adam Keil, Mutter: Luitgard Keil, geb. Wahl

1954 - 1959	Grundschule Waldstetten
1959 - 1967	Parler-Gymnasium Schwäbisch Gmünd
1967	Abitur
1967 - 1969	Wehrdienst
1969 - 1980	Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen, beginnend mit Rechtswissenschaft, ab 1970 Chemie
Mai 1980	Diplom Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Kraus, Universität Hohenheim mit dem Thema: Versuche zur Darstellung von Epoxyazadiron
Juni 1980 bis Juni 1984	Anfertigung der vorliegenden Arbeit unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. W. Kraus am Institut für Chemie der Universität Hohenheim

Meine akademische Ausbildung verdanke ich:
M. Baumann, E. Bayer, W. Braun, E. Breitmaier, G. Gauglitz, F. Gönnenwein, R. Hamm, G. Häfelinger, M. Hanack, V. Hoffmann, S. Kemmler-Sack, W. Kiedaisch, W. Kraus, D. Krug, E. Lindner, I.-P. Lorenz, H. Mauser, Eu. Müller, M. Mutter, H. Oberhammer, D. Oelkrug, H. Pauschmann, G. Pausewang, E. Pracht, H. Rau, A. Rieker, W. Rüdorff, W. Rundel, F. F. Seelig, J. Strähle, H. Straub, E. Stumpp, H. Suhr, W. Voelter, W. Zeil.

dissertationsdruck · vervielfältigungen
f. u. t. müllerbader
Forststraße 18 · 7024 Filderstadt 4 (Plattenhardt)
Telefon (07 11) 77 15 67